

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 173**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2013** **PCT/US2013/058934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014** **WO14040025**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2013** **E 13835579 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 2892555**

54 Título: **Inmunógenos de anticuerpos ampliamente neutralizantes del VIH-1, métodos de generación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

10.09.2012 US 201261699221 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2021

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE
(50.0%)
125 Broad Street 9th Floor
New York, NY 10004, US y
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHIEF, WILLIAM, R.;
CORREIA, BRUNO E.;
KULP, DANIEL, W. y
JACAK, RON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 807 173 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

Inmunógenos de anticuerpos ampliamente neutralizantes del VIH-1, métodos de generación y usos de los mismos

5 Campo de la invención

Esta solicitud se refiere a inmunógenos de anticuerpos monoclonales ampliamente neutralizantes específicos para VIH-1, tales como anticuerpos monoclonales neutralizantes amplios y potentes específicos para VIH-1 y su generación y métodos de uso. La neutralización amplia sugiere que los anticuerpos pueden neutralizar los aislados de VIH-1 de diferentes individuos. Los inmunógenos o las vacunas que pueden provocar tales respuestas asociadas a anticuerpos son útiles en composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento del VIH, y para el diagnóstico y control de la infección por VIH.

15 Antecedentes de la invención

El SIDA, o síndrome de inmunodeficiencia adquirida, es causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y se caracteriza por varios rasgos clínicos que incluyen síndromes de desgaste, degeneración del sistema nervioso central y una inmunosupresión profunda que da como resultado infecciones oportunistas y tumores malignos. El VIH es un miembro de la familia lentivirus de retrovirus animales, que incluyen el virus visna de ovejas y los virus de inmunodeficiencia bovina, felina y simia (SIV). Hasta el momento se han identificado dos tipos de VIH estrechamente relacionados, designados VIH-1 y VIH-2, de los cuales el VIH-1 es, con mucho, la causa más común de SIDA. Sin embargo, el VIH-2, que difiere en estructura genómica y antigenicidad, causa un síndrome clínico similar.

Una partícula infecciosa del VIH consta de dos cadenas idénticas de ARN, cada una de aproximadamente 9,2 kb de longitud, empaquetadas dentro de un núcleo de proteínas virales. Esta estructura central está rodeada por una envoltura bicapa fosfolipídica derivada de la membrana de la célula huésped que también incluye proteínas de membrana codificadas por virus (Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4a edición, W.B. Saunders Company, 2000, página 454). El genoma del VIH tiene la organización característica 5'-LTR-Gag-Pol-Env-LTR-3' de la familia de los retrovirus. Las repeticiones terminales largas (LTR) en cada extremo del genoma viral sirven como sitios de unión para las proteínas reguladoras de la transcripción del huésped y regulan la integración viral en el genoma del huésped, la expresión del gen viral y la replicación viral.

El genoma del VIH codifica varias proteínas estructurales. El gen gag codifica proteínas estructurales del núcleo y matriz de la nucleocápside. El gen pol codifica las enzimas transcriptasa inversa (RT), integrasa (IN) y proteasa viral (PR) necesarias para la replicación viral. El gen tat codifica una proteína que se requiere para el alargamiento de las transcripciones virales. El gen rev codifica una proteína que promueve la exportación nuclear de ARN virales empalmados o no empalmados de manera incompleta. El producto del gen vif mejora la infectividad de las partículas virales. El producto del gen vpr promueve la importación nuclear de ADN viral y regula la detención del ciclo celular en G2. Los genes vpu y nef codifican proteínas que subregulan la expresión de CD4 de la célula huésped y mejoran la liberación de virus de las células infectadas. El gen env codifica la glicoproteína de la envoltura viral que se traduce como un precursor de 160 kilodaltons (kDa) (gp160) y se escinde por una proteasa celular para producir la glicoproteína de la envoltura externa de 120 kDa (gp120) y la glicoproteína de la envoltura transmembrana de 41 kDa (gp41), que son necesarias para la infección de las células (Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, cuarta edición, WB Saunders Company, 2000, páginas 454-456). gp140 es una forma modificada de la glicoproteína Env, que contiene la porción externa de la glicoproteína de la envoltura de 120 kDa y la parte extracelular de la porción gp41 de Env y tiene características tanto de gp120 como de gp41. El gen nef se conserva entre los lentivirus de primates y es uno de los primeros genes virales que se transcribe después de la infección. *In vitro*, se han descrito varias funciones, incluida la subregulación de la expresión superficial de CD4 y MHC clase I, la señalización y activación de células T alteradas y una mayor infectividad viral.

La infección por VIH se inicia con gp120 en la unión de partículas virales a las moléculas del receptor de quimiocina y CD4 (por ejemplo, CXCR4, CCR5) en la membrana celular de células objetivo tales como células T CD4+, macrófagos y células dendríticas. El virus unido se fusiona con la célula objetivo y transcribe en forma inversa el genoma de ARN. El ADN viral resultante se integra en el genoma celular, en el que dirige la producción de nuevo ARN viral y, por lo tanto, proteínas virales y nuevos viriones. Estos viriones brotan de la membrana celular infectada y establecen infecciones productivas en otras células. Este proceso también mata la célula infectada originalmente. El VIH también puede matar células indirectamente porque el receptor de CD4 en las células T no infectadas tiene una fuerte afinidad por la gp120 expresada en la superficie de las células infectadas. En este caso, las células no infectadas se unen, a través de la interacción del receptor de CD4 con gp120, a las células infectadas y se fusionan para formar un sincitio, que no puede sobrevivir. La destrucción de los linfocitos T CD4+, que son críticos para la defensa inmune, es una causa importante de la disfunción inmune progresiva que es el sello distintivo de la progresión de la enfermedad del SIDA. La pérdida de células T CD4+ perjudica gravemente la capacidad del cuerpo para combatir a la mayoría de los invasores, pero tiene un impacto particularmente severo en las defensas contra virus, hongos, parásitos y ciertas bacterias, incluidas las micobacterias.

La investigación sobre la glicoproteína Env ha demostrado que el virus tiene muchos mecanismos de protección eficaces con pocas vulnerabilidades (Wyatt y Sodroski, *Science*. 19 de junio de 1998; 280 (5371): 1884-8). Para la fusión con sus células objetivo, el VIH-1 utiliza un complejo Env trimérico que contiene las subunidades gp120 y gp41 (Burton et al., *Nat Immunol*. Marzo de 2004; 5 (3): 233-6). El potencial de fusión del complejo Env se desencadena por la participación del receptor de CD4 y un correceptor, generalmente CCR5 o CXCR4. Los anticuerpos neutralizantes parecen funcionar uniéndose al trimero maduro en la superficie del virión y evitando los eventos iniciales de unión del receptor, o uniéndose después de la unión al virión e inhibiendo el proceso de fusión (Parren y Burton, *Adv Immunol*. 2001; 77: 195-262). En el último caso, los anticuerpos neutralizantes pueden unirse a epítomos cuya exposición se potencia o desencadena por la unión del receptor. Sin embargo, dados los posibles efectos antivirales de los anticuerpos neutralizantes, no es inesperado que el VIH-1 haya desarrollado múltiples mecanismos para protegerlo de la unión de los anticuerpos (Johnson & Desrosiers, *Annu Rev Med*. 2002; 53: 499-518).

La mayoría de las vacunas experimentales contra el VIH-1 probadas en primates humanos y/o no humanos sugiere que una vacuna exitosa incorporará inmunógenos que produzcan anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNab) e inmunidad robusta mediada por células. La glicoproteína de la envoltura del VIH-1 (Env) es la principal proteína viral involucrada en la entrada del virus y también es el objetivo principal para anticuerpos neutralizantes, pero debido a las estrategias de evasión inmune y la variabilidad extrema de la secuencia de Env, la generación de bNab ha sido una tarea desalentadora (Phogat S, Wyatt R. *Curr Pharm Des*. 2007; 13: 213-27, Phogat S, et al., *J Intern Med*. 2007 262: 26-43, Karlsson Hedestam GB, et al., *Nat Rev Microbiol*. 2008 6: 143 -55).

La capacidad de provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes y potentes es un desafío importante en el desarrollo de una vacuna contra el VIH-1. Es decir, el VIH-1 ha desarrollado una impresionante variedad de estrategias para evadir la neutralización mediada por anticuerpos, los bNab se desarrollan con el tiempo en una proporción de individuos infectados con VIH-1, y se ha aislado un puñado de anticuerpos monoclonales ampliamente neutralizantes de donantes infectados con clado B. Estos anticuerpos tienden a mostrar menos amplitud y potencia contra los virus no clado B, y reconocen los epítomos en el virus que hasta ahora no han logrado generar amplias respuestas neutralizantes cuando se incorporan a una amplia gama de inmunógenos.

Los anticuerpos monoclonales ampliamente reactivos en forma cruzada definen epítomos para el desarrollo de vacunas contra el VIH y otros virus altamente mutables. Las estructuras cristalinas están disponibles para varios de estos complejos de anticuerpo-epítomo, pero se necesitan métodos para traducir esa información estructural en inmunógenos que provocan nuevamente anticuerpos similares. Se pueden usar métodos informáticos para diseñar andamiajes de epítomos en los que se trasplantan epítomos estructurales contiguos a proteínas de andamiaje para la estabilización conformacional y la presentación inmune. Los andamiajes de epítomos diseñados para el epítomo del VIH 4E10 pobremente inmunogénico pero conservado exhibieron una alta imitación estructural del epítomo, unidos con mayores afinidades al anticuerpo monoclonal (mAb) 4E10 que el péptido afín e inhibieron la neutralización del VIH mediante los sueros VIH+. La inmunización de conejos con un andamiaje de epítomo indujo anticuerpos con especificidad estructural muy similar al mAb 4E10, un avance importante hacia la obtención de actividad neutralizante. Los resultados demuestran que los andamiajes de epítomos diseñados por medios informáticos son valiosos como reactivos serológicos específicos de la estructura y como inmunógenos para provocar anticuerpos con especificidad estructural predeterminada. (Véase Correia et al., *Structure*, septiembre 8 de 2010; 18 (9): 1116-26). Además, si bien se informó que un péptido de VIH lineal se une a 10E8 con una afinidad de 17 nM (Huang et al., *Nature* 2012), los andamiajes de 10E8 descritos en el presente documento se unen a 10E8 con afinidades significativamente más altas (más de hasta un factor de 1000). Las afinidades mejoradas en comparación con el péptido lineal pueden reflejar la estabilización conformacional proporcionada por el andamiaje y pueden conferir beneficios significativos para la obtención de anticuerpos específicos de estructura contra este epítomo.

El diseño informático de proteínas es prometedor para el diseño de vacunas y otras aplicaciones. El epítomo 4E10 del VIH se ha trasplantado previamente en andamiajes de proteínas que no son de VIH para la estabilización estructural y la presentación inmune. Se desarrollan dos métodos para optimizar la estructura de un antígeno, la remodelación y recubrimiento superficial de la cadena principal flexible, y estos métodos se aplican a un andamiaje 4E10. En la remodelación de la cadena principal flexible, un segmento de la cadena principal existente se reemplaza por un segmento diseñado nuevo de longitud previamente especificada y estructura secundaria. Con la remodelación, un dominio potencialmente inmunodominante en el andamiaje se reemplaza por un segmento de bucle de hélice que hizo contacto íntimo con el núcleo de la proteína. Los tres diseños de recorte de dominio probados experimentalmente tuvieron una estabilidad térmica mejorada y una afinidad de unión similar por el anticuerpo 4E10 en comparación con el andamiaje original. Una estructura cristalina de un diseño tenía un RMSD de cadena principal de 0,8 Å para el modelo informático en la región reconstruida. La comparación de la reactividad del andamiaje parental y recortado con sueros antiparentales confirmó la eliminación de un dominio inmunodominante. En el recubrimiento superficial, la superficie de un antígeno fuera del epítomo objetivo se rediseña para obtener variantes que mantengan solo el epítomo objetivo. Se diseñaron variantes de recubrimiento superficial de dos andamiajes en los que se mutaron 50 posiciones que representaban el 40% de las secuencias de proteínas. Los análisis de parches de superficie indicaron que la mayoría de las posibles huellas de anticuerpos fuera del epítomo 4E10 fueron alteradas. Las variantes con recubrimiento superficial mantuvieron la estabilidad térmica y la afinidad de unión. Estos resultados indican que la remodelación y el recubrimiento superficial de la cadena principal flexible son herramientas útiles para la optimización

de antígenos y la ingeniería de proteínas en general (véase Correia et al., J Mol Biol, 7 de enero; 405 (1): 284-97. Epub 2010, 20 de octubre de 2011).

Correia, B. et al., Structure, Current Biology Ltd., vol. 18, número 9, páginas 1116-1126 (2010) describen que el diseño informático de andamiajes de epítomos permite la inducción de anticuerpos específicos para un epítomo de vacuna contra el VIH poco inmunogénico.

Correia, B. et al., J. Mol. Biol., Vol. 405, páginas 284-297 (2011) describen el diseño informático de proteínas usando remodelación y recubrimiento superficial de la cadena principal flexible. En este artículo, los autores proporcionan estudios de casos en el diseño de antígenos basado en la estructura.

McEnery, R., Informe IAVI, vol. 16, No.2, páginas 10-14 (2012) proporciona un resumen sobre una reunión de especialistas en vacunas contra el VIH en Keystone (EE. UU.). Ella informa que varias charlas hicieron claridad sobre cómo se aplica la biología estructural e informática a los inmunógenos de ingeniería inversa que podrían inducir bNAb.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a vacunas de andamiaje 10E8 para activar células B similares a 10E8, impulsar una mutación somática apropiada e inducir anticuerpos de unión de reactividad cruzada y neutralizantes contra la gp41 del VIH en macacos rhesus.

La invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento del solicitante de andamiajes 10E8 que se unen a 10E8 maduros, y andamiajes 10E8 que se unen con afinidad detectable a la línea germinal 10E8. Por el contrario, solo dos de los cinco andamiajes 4E10 parentales tienen afinidad detectable por 10E8, que eran considerablemente más débiles (por un factor de ~30) que los andamiajes 10E8 correspondientes. Y ninguno de los andamiajes 4E10 parentales tienen afinidad detectable por la línea germinal 10E8. Por lo tanto, las mutaciones manipuladas en los andamiajes 4E10 parentales confieren un beneficio inesperado de una unión fuerte a 10E8 maduro y, en dos casos, una unión débil a la línea germinal 10E8. Estos andamiajes 10E8 ahora están habilitados como inmunógenos 10E8.

Estas y otras realizaciones se divulgan o son obvias y están abarcadas por la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 representa un péptido que interactúa con 10e8 e incluye la numeración de residuos para posiciones relevantes del epítomo del VIH.

La Figura 2 representa modelos para los andamiajes T93v2RT12-1 y T117v2-1 en comparación con el péptido del epítomo 10E8 que abarca los residuos del VIH 671-683.

La Figura 3 representa datos de ELISA que indican respuestas específicas del epítomo 10E8 en NHP, a partir del refuerzo principal heterólogo. Sueros de 2 semanas después de la inmunización 3 y ELISA contra • 10E8_T117v2-1_RS1 y ○ 10E8_T117v2-1_RS1_KO3. 10E8T117v2 y 10E8_T117v2-1 se refieren a la misma proteína.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un nuevo inmunógeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal amplia y potentemente neutralizante 10E8 contra el VIH y métodos para generar anticuerpos adicionales que se unen específicamente a dicho inmunógeno. En particular, la presente invención se refiere a un inmunógeno 10E8 que consiste en la secuencia de aminoácidos:

10E8_T298v2

GSEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNAPTGLPVEPVGVGAIPHTDSKYVR
QNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPRVVFMLALGNWFDITNVLWWIKAVIQADFM
QQLLRMNDDEIYQSIYTRISEAAGMAGIHFRRHVVRHLG.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende este inmunógeno, a una molécula de ácido nucleico que codifica el inmunógeno y a métodos para provocar anticuerpos contra el inmunógeno de la presente invención.

La solicitud se basa en nuevos anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos que neutralizan la infección por VIH. En algunas realizaciones, estos anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos tienen una potencia particularmente alta para neutralizar la infección por VIH *in vitro* a través de múltiples clados. Tales anticuerpos son

deseables, ya que solo se requieren bajas concentraciones para neutralizar una cantidad dada de virus. Esto facilita mayores niveles de protección mientras se administran menores cantidades de anticuerpos.

La solicitud también se refiere a varios métodos y usos que implican los anticuerpos de la presente descripción y los epítopos a los que se unen.

La descripción proporciona nuevos anticuerpos monoclonales o recombinantes que tienen una potencia particularmente alta para neutralizar el VIH. La solicitud también proporciona fragmentos de estos anticuerpos recombinantes o monoclonales, particularmente fragmentos que retienen la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos, por ejemplo, que retienen al menos una región determinante de complementariedad (CDR) específica para proteínas de VIH. En esta memoria descriptiva, por "alta potencia en la neutralización del VIH" se entiende que una molécula de anticuerpo neutraliza el VIH en un ensayo estándar a una concentración inferior a los anticuerpos conocidos en la técnica.

La molécula de anticuerpo puede tener concentraciones de menos de aproximadamente 1 µg/mL, entre aproximadamente 1 - 10 µg/mL o mayores de aproximadamente 10 µg/mL para lograr una neutralización del 50% u 80%.

En otra realización, la molécula de anticuerpo puede neutralizar a una concentración de 0,16 µg/mL o inferior (es decir, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,016, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004 o inferior), preferiblemente 0,016 µg/mL o inferior (una concentración de anticuerpos de 10^{-8} o inferior, preferiblemente 10^{-9} M o inferior, preferiblemente 10^{-10} M o inferior, es decir, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M o inferior). Esto significa que solo se requieren concentraciones muy bajas de anticuerpos para la neutralización del 50% de un aislado clínico de VIH *in vitro*. La potencia se puede medir usando un ensayo de neutralización estándar como se describe en la técnica.

Los anticuerpos son capaces de neutralizar el VIH. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, como lo describen R. Kennet et al., en "Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines; Progress and Applications". Plenum Press (Nueva York), 1984. Otros materiales y métodos aplicados se basan en procedimientos conocidos, por ejemplo, como se describe en J. Virol. 67: 6642-6647, 1993.

Estos anticuerpos pueden usarse como agentes profilácticos o terapéuticos tras una formulación apropiada, o como una herramienta de diagnóstico.

Un "anticuerpo neutralizante" es aquel que puede neutralizar la capacidad de ese patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un huésped y/o en células objetivo *in vitro*. La solicitud proporciona un anticuerpo humano monoclonal neutralizante, en el que el anticuerpo reconoce un antígeno del VIH.

Preferiblemente, un anticuerpo es un nuevo anticuerpo monoclonal denominado en el presente documento VRC-PG-04 o VRC-PG-05. Estos anticuerpos se aislaron inicialmente de muestras humanas obtenidas del Protocolo G. de IAVI. Se ha demostrado que estos anticuerpos neutralizan el VIH *in vitro*.

Las CDR de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. De manera similar, las CDR de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente. La posición de los aminoácidos de la CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT como: posiciones IMGT de CDR1 27 a 38, posiciones IMGT de CDR2 56 a 65 y posiciones IMGT de CDR3 105 a 117 (Lefranc, M P. et al. 2003 IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev Comp Immunol. 27(1):55-77; Lefranc, M P. 1997. Unique database numbering system for immunogenetic analysis. Immunology Today, 18:509; Lefranc, M P. 1999. The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains. The Immunologist, 7:132-136).

Como se usa en este documento, un anticuerpo neutralizante puede inhibir la entrada del virus VIH-1 con un índice de neutralización $> 1,5$ o $> 2,0$. Los anticuerpos ampliamente neutralizantes y potentes pueden neutralizar más del 50% de los virus VIH-1 (de diversos clados y diferentes cepas dentro de un clado) en un ensayo de neutralización.

Los ensayos para la detección de anticuerpos neutralizantes son conocidos en la técnica. Anteriormente se ha descrito un enfoque de ensayo de neutralización (Binley JM, et al., (2004). Comprehensive Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. J. Virol. 78: 13232-13252). Los virus pseudotipados pueden generarse cotransfectando células con al menos dos plásmidos que codifican el ADNc de Env soluble de la presente invención y el resto del genoma del VIH por separado. En el vector de codificación del genoma del VIH, el gen Env puede ser reemplazado por el gen de luciferasa de luciérnaga. Los sobrenadantes transfectantes que contienen el virus pseudotipado se pueden incubar conjuntamente durante la noche con sobrenadantes de células B derivados de la activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) primarias de un donante infectado. Las células transfectadas de manera estable con y que expresan CD4 más los correceptores CCR5 y CXCR4 pueden agregarse a la mezcla e incubarse durante 3 días a 37 °C. Las células infectadas pueden cuantificarse por luminometría.

El índice de neutralización puede expresarse como la relación de unidades de luminiscencia relativa normalizadas (RLU) de la cepa viral de prueba con respecto a aquella de un virus de control derivado del mismo sobrenadante de cultivo de células B de prueba. Los valores de corte utilizados para distinguir los éxitos de neutralización pueden determinarse por el índice de neutralización de un gran número de "pozos de control negativo" que contienen sobrenadantes de cultivo de células B derivados de donantes sanos. Tal método fue exitoso para el aislamiento y caracterización de PG9 y PG16.

El método de la patente de los Estados Unidos No. 7.386.232 también se puede utilizar para la detección de anticuerpos ampliamente neutralizantes. Se puede construir una proteína de fusión envoltura-enzima uniendo una enzima al extremo terminal C de una proteína de la envoltura. Las partículas virales que pueden comprender la proteína de fusión y la glicoproteína de la envoltura de tipo silvestre y/o soluble pueden generarse y usarse para infectar células objetivo en presencia de sueros de pacientes. Las actividades de la enzima medidas en tales células infectadas son medidas de unión del virus y entrada a las células objetivo que están mediadas por la proteína de la envoltura viral de tipo silvestre. Los ejemplos de enzimas que se pueden usar para generar la proteína de fusión incluyen, pero no se limitan a, luciferasa, fosfatasa alcalina bacteriana o placentaria, β -galactosidasa y proteínas fluorescentes tales como proteínas fluorescente verde o toxinas. El ensayo, en general, también puede llevarse a cabo en una placa de 96 pozos. La disminución de las actividades enzimáticas en presencia de los sueros indica que hay anticuerpos neutralizantes en los sueros.

Para aislar mAbs dirigidos a CD4b, se prefiere un método de clasificación de células B de memoria específica de antígeno (Wu et al., (Science 329; 856 (2010))), junto con PCR de células individuales, para amplificar genes de cadena pesada y ligera de IgG del ADNc de células B individuales (JF Scheid et al., Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. Nature 458, 636 (2009) y J. Wrammert et al., Nature 453, 667 (2008)). Las sondas de Env mutantes se expresan con una secuencia de aminoácidos etiquetada que permite que el marcado de biotina las distinga mediante análisis FACS después de la marcación con estreptavidina (SA) conjugada con los fluorocromos de alofococianina (SA-APC) o ficoeritrina (SA-PE), respectivamente. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante se incuban con las sondas de Env mutantes marcadas, y las células B de memoria específicas de antígeno individuales se clasificaron en pozos de una placa de microtitulación después de seleccionar las células B de memoria (CD19+, CD20+, IgG+) que se unen a la sonda de referencia. Las células B de memoria específicas de la sonda de referencia se clasifican y los genes de cadena pesada y ligera coincidentes se amplifican. Después de la clonación en vectores de expresión de IgG1 que reconstituyen las regiones constantes de la cadena pesada y ligera, se expresan los mAbs de IgG completos.

La etapa de clonación para separar clones individuales de la mezcla de células positivas puede llevarse a cabo usando dilución limitante, micromanipulación, deposición de células individuales por clasificación celular u otro método conocido en la técnica. Preferiblemente, la clonación se lleva a cabo usando dilución limitante.

Los clones de células B inmortalizadas de la invención se pueden usar de varias maneras, por ejemplo, como fuente de anticuerpos monoclonales, como fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para investigación, etc.

Los epítomos reconocidos por estos anticuerpos pueden tener varios usos. Los epítomos y mimótopos en forma purificada o sintética se pueden usar para aumentar las respuestas inmunes (es decir, como una vacuna, o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para examinar el suero del paciente en busca de anticuerpos que inmunorreaccionan con los epítomos o mimótopos. Preferiblemente, dicho epítomo o mimótopo, o antígeno que puede comprender dicho epítomo o mimótopo se usa como una vacuna para elevar una respuesta inmune. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en un método para controlar la calidad de las vacunas, en particular para comprobar que el antígeno en una vacuna contenga el epítomo inmunogénico correcto en la conformación correcta.

Los epítomos también pueden ser útiles en la detección de ligandos que se unen a dichos epítomos. Tales ligandos bloquean preferiblemente los epítomos y, por lo tanto, previenen la infección.

Los compuestos que son ligantes de anticuerpos neutralizantes forman un aspecto adicional de la solicitud; y, tales compuestos pueden usarse en métodos de tratamientos médicos, tales como para el diagnóstico, prevención o tratamiento del VIH o para la obtención de anticuerpos para el diagnóstico del VIH, incluido el uso en vacunas. Además, dichos compuestos pueden usarse en la preparación de medicamentos para tales tratamientos o prevención, o composiciones para fines de diagnóstico. Los compuestos pueden emplearse solos o en combinación con otros tratamientos, vacunas o medicamentos profilácticos; y, los compuestos pueden usarse en la preparación de medicamentos combinados para tales tratamientos o prevención, o en kits que contienen el compuesto y el otro tratamiento o medicamento profiláctico.

Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "secuencia de aminoácidos" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por fracciones químicas distintos de los aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro, glicosilación,

lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcación o bioactivo.

Como se usa en el presente documento, los términos "antígeno" o "inmunógeno" se usan indistintamente para referirse a una sustancia, típicamente una proteína, que es capaz de inducir una respuesta inmune en un sujeto. El término también se refiere a proteínas que son inmunológicamente activas en el sentido de que una vez administradas a un sujeto (ya sea directamente o administrando al sujeto una secuencia de nucleótidos o un vector que codifica la proteína) puede provocar una respuesta inmune de tipo humoral y/o celular dirigida contra esa proteína.

El término "anticuerpo" incluye moléculas intactas así como fragmentos de los mismos, tales como Fab, F(ab')₂, Fv y scFv que son capaces de unirse al determinante del epítipo. Estos fragmentos de anticuerpos conservan cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor e incluyen, por ejemplo:

(i) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

(ii) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(iii) F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro;

(iv) scFv, que incluye un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de una cadena pesada y ligera como una molécula de cadena única fusionada.

Los métodos generales para hacer estos fragmentos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988)).

Un "anticuerpo neutralizante" puede inhibir la entrada del virus VIH-1, por ejemplo SF162 y/o JRCSF con un índice de neutralización > 1,5 o > 2,0. Los anticuerpos ampliamente neutralizantes y potentes pueden neutralizar más de aproximadamente el 50% de los virus VIH-1 (de diversos clados y diferentes cepas dentro de un clado) en un ensayo de neutralización. La concentración inhibitoria del anticuerpo monoclonal puede ser inferior a aproximadamente 25 mg/mL para neutralizar aproximadamente el 50% del virus de entrada en el ensayo de neutralización.

Un "anticuerpo aislado" o "anticuerpo no natural" es uno que se ha separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purifica: (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo de acuerdo por lo determinado por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más del 99% en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del terminal N o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria; o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que pueden comprender la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminarse por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante la metodología de hibridoma descrita por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, de animales eucariotas o de plantas (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Un "fragmento de anticuerpo" puede comprender una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diácuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de Estados Unidos No. 5.641.870; Zapata et al., *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Debe entenderse que las proteínas, incluidos los anticuerpos, pueden diferir de las secuencias exactas ilustradas y descritas en el presente documento. Por lo tanto, la invención contempla eliminaciones, adiciones y sustituciones a las secuencias mostradas, siempre que las secuencias funcionen de acuerdo con los métodos de la invención. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas generalmente serán de naturaleza conservadora, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos generalmente se dividen en cuatro familias: (1) aspartato y glutamato ácidos; (2) lisina, arginina, histidina básicos; (3) alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano no polares; y (4) glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina polares no cargados. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican algunas veces como aminoácidos aromáticos. Es razonablemente predecible que un reemplazo aislado o no natural de leucina con isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato con un glutamato o viceversa; una treonina con una serina o viceversa; o un reemplazo conservador similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante en la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias ilustradas y descritas pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro del alcance de la invención.

Como se usa en el presente documento, los términos "secuencias de nucleótidos" y "secuencias de ácido nucleico" se refieren a secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), que incluyen, sin limitación, ARN mensajero (ARNm), híbridos de ADN/ARN o ácidos nucleicos sintéticos. El ácido nucleico puede ser monocatenario o parcial o completamente bicatenario (dúplex). Los ácidos nucleicos dúplex pueden ser homodúplex o heterodúplex.

Como se usa en el presente documento, el término "transgén" puede usarse para referirse a secuencias de nucleótidos "recombinantes" que pueden derivarse de cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención. El término "recombinante" significa una secuencia de nucleótidos que ha sido manipulada "por el hombre" y que no ocurre en la naturaleza, o está unida a otra secuencia de nucleótidos o se encuentra en una disposición diferente en la naturaleza. Se entiende que manipulado "por el hombre" significa manipulado por algunos medios artificiales, incluido el uso de máquinas, optimización de codones, enzimas de restricción, etc.

Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden mutarse de tal manera que la actividad de las proteínas codificadas *in vivo* se anule. Las secuencias de nucleótidos pueden codón optimizado, por ejemplo, los codones pueden optimizarse para uso humano. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden estar mutadas para anular la función normal *in vivo* de las proteínas codificadas, y de codón optimizado para uso humano. Por ejemplo, cada una de las secuencias Gag, Pol, Env, Nef, RT e Int pueden alterarse de esta manera.

En lo que respecta a la optimización de codones, las moléculas de ácido nucleico tienen una secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos de la invención y pueden diseñarse para emplear codones que se usan en los genes del sujeto en el que se va a producir el antígeno. Muchos virus, incluido el VIH y otros lentivirus, usan una gran cantidad de codones raros y, al alterar estos codones para que se correspondan con los codones comúnmente utilizados en el sujeto deseado, se puede lograr una mayor expresión de los antígenos. En una realización preferida, los codones utilizados son codones "humanizados", es decir, los codones son aquellos que aparecen con frecuencia en genes humanos altamente expresados (Andre et al., J. Virol. 72: 1497-1503, 1998) en lugar de esos codones que el VIH usa con frecuencia. Tal uso de codones proporciona una expresión eficiente de las proteínas transgénicas del VIH en células humanas. Se puede usar cualquier método adecuado de optimización de codones. Tales métodos, y la selección de tales métodos, son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, hay varias compañías que optimizarán los codones de secuencias, tales como Geneart (geneart.com). Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos pueden optimizarse fácilmente con codones.

Esta solicitud divulga vacunas con andamiajes 10E8 para activar células B similares a 10E8, impulsar una mutación somática apropiada e inducir anticuerpos de unión cruzada y neutralizantes contra la gp41 del VIH en macacos rhesus.

El 10E8 es un anticuerpo nuevo, altamente potente y ampliamente neutralizante contra el VIH recientemente descubierto. La inducción de anticuerpos similares a 10E8 es un objetivo principal para el campo del diseño de la vacuna contra el VIH. Esta invención se refiere a la identificación de inmunógenos que se unen a 10E8.

El 10E8 se dirige principalmente a los residuos 671-683 que abarcan la hélice de la región externa proximal de la membrana (MPER) de Env del VIH de manera similar al anticuerpo 4E10, pero 10E8 es significativamente más potente y carece de signos detectables de autorreactividad o poliespecificidad que se hayan observado para 4E10. 10E8 utiliza una HCDR3 larga (22 aa) para hacer la mayoría de sus contactos importantes, y el gen D en el anticuerpo 10E8 maduro no está mutado de la línea germinal humana. La conformación de la hélice de MPER unida a 10E8 tiene una conformación muy similar a la de la hélice unida a 4E10. Sin embargo, la interacción de 10E8 con su epítipo tiene diferencias importantes en comparación con 4E10. La neutralización de 10E8 requiere una K o R en la posición 683, mientras que 4E10 no interactúa con los residuos en esa posición. 10E8 utiliza su HCDR3 para contactar su epítipo de proteína y no se une a los lípidos con afinidad significativa, mientras que se cree que 4E10 emplea su HCDR3 para contactar a los lípidos. La estructura cristalina de 10E8 unida a un péptido de MPER parece revelar todo el epítipo 10E8, en contraste con el caso de 4E10.

Se diseñó previamente un conjunto de andamiajes de epítomos para el anticuerpo 4E10. Estos andamiajes estabilizan la conformación helicoidal del epítomo y se unen muy fuertemente a 4E10. Las estructuras cristalinas de varios andamiajes diferentes, tanto sin ligar como ligados a 4E10, demuestran que los andamiajes imitan con precisión la conformación del epítomo helicoidal deseado (véase Correia et al., Structure 2010, Correia et al., JMB 2011, y Correia et al., Protein Science 2011).

Dos andamiajes 4E10 informados en el presente documento son variantes de recubrimiento superficial de T93 que no han sido publicadas o divulgadas públicamente, 4E10_T93_RT1_1 y 4E10_T93_RT1_2.

La información sobre el anticuerpo 10E8 conduce a una evaluación de si los andamiajes 4E10 existentes podrían modificarse para actuar como andamiajes de epítomo para el epítomo 10E8. Si bien se informa que 10E8 requiere una K o R en la posición 683, ninguno de los andamiajes 4E10 descritos anteriormente tenía una K o R en esa posición. En una realización ventajosa, los andamiajes 4E10 se rediseñan para tratar de acomodar la unión 10E8, (1) colocando K en la posición del andamiaje correspondiente a 683 y (2) haciendo algunas mutaciones seleccionadas en el andamiaje adyacente al epítomo para reducir el tamaño de aminoácidos cerca pero no dentro del epítomo. Un supuesto precursor de la línea germinal para 10E8, como IgG está diseñado y producido.

Los andamiajes 4E10 parentales utilizados se enumeran a continuación, con los residuos del epítomo 4E10 indicados en negrita.

4E10_T93 (Correia et al., Structure 2010; PDBID: 3LHP)

HHHHHHGSISDIRKDAEVRMDKAVEAFKNKLDKFKA^{AVRKVFPTEERIKDWLKIVRGE}
AEQARVAVRNVGRDANDKAAALGKDKEIN^{WFDISQSLWDVQKLTDAAIKKIEAALAD}
MEAWLTQG

4E10_T93_RT1_1 (T93 recubierto en la superficie, no divulgado anteriormente)

GEAQRVRQEAKERMKRAVEKFKKELKEFNTEVEKKEPRQQRIQKWEQIVEERAKKAED
EVKKVGKEANDRAAKLGQDPQVN^{WFDISQILWDVQKL}TQEAIEEIRKALEQMRRWLQ
RGLEHHHHHH

4E10_T93_RT1_2 (T93 recubierto en la superficie, no divulgado anteriormente)

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKADEAKK
RVEEVGDAQANDEAAQLGNDPNVN^{WFDISQVLWDVQKL}TEKAINIDDALKMKMDWL
ESGLEHHHHHH

4E10_T117 (Correia et al., Structure 2010; PDBID: 3LF6)

HHHHHHNAMQGIHFRRHVYVRHLPKEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQN
FPTGLPVEPVGV^{AIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGN}
^{WFDITNVLWWIMDVIQDEDFM}QQLVMNDDEIYQSIYTRISE

4E10_T298 (Correia et al., Prot Sci 2011; PDBID: 3T43)

GHHHHHHGSEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNAPTGLPVEPVGV^{AIPH}
TDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGN^{WFDITNVLWWIMD}
VIQDADFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISEAAGMAGIHFRRHVYVRHLPLEHHHHHH

10E8_T298v2 (de acuerdo con la presente invención)

GSEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNAPTGLPVEPVGV^{AIPHTDSKYVR}
QNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGN^{WFDITNVLWWIKAVIQDADFM}
QQLLRMNNDDEIYQSIYTRISEAAGMAGIHFRRHVYVRHLGLEHHHHHH

10E8_T117v2

NAMQGIHFRRHYVRHLPKEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNFPTGLPV
EPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGNWFDITN
VLWWIKAVIQDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISELEHHHHHH

10E8_T93v2 codificó las siguientes modificaciones en relación con 4E10_T93:

GRDANDK -> GRDAADK para reducir el choque potencial con 10E8 cerca de L679 y K683 del epítipo
LWDVQKL -> LWDVKKL para introducir K683 en el epítipo 10E8

La etiqueta his se movió desde el terminal N hasta el terminal C, para alejar la etiqueta his del epítipo, lejos de la interacción potencial con 10E8.

10E8_T93v2_RT1_1 codificó las siguientes modificaciones en relación con 4E10_T93RT1_1:

a. GKEANDR -> GKEAADR para reducir el choque potencial con 10E8 cerca de L679 y K683 del epítipo
b. LWDVQKL -> LWDVKKL para introducir K683 en el epítipo 10E8

10E8_T93v2_RT1_2 codificó las siguientes modificaciones en relación con 4E10_T93RT1_2:

GDQANDE -> GDQAADE para reducir el choque potencial con 10E8 cerca de L679 y K683 del epítipo
LWDVQKL -> LWDVKKL para introducir K683 en el epítipo 10E8

10E8_T298v2 codificó las siguientes modificaciones en relación con 4E10_T298:

Se eliminó la etiqueta his del terminal N porque no es necesaria

Doble mutación: LWWIMDVIQ -> LWWIKAVIQ para introducir K683 en el epítipo 10E8 y reducir el ácido aspártico adyacente a una alanina para minimizar las posibilidades de interacciones de anticuerpos (favorables o desfavorables) mientras se mantiene la preferencia de la estructura secundaria helicoidal local

QQLLMND -> QQLLRMND para mejorar la solubilidad cambiando un aminoácido hidrófobo expuesto a la superficie por uno polar, y para mejorar la estabilidad cambiando de V (propensión helicoidal pobre) a R (propensión helicoidal buena) en una posición helicoidal en la estructura.

Agregar una glicina extra antes de la etiqueta his del terminal C para mejorar la purificación de Ni⁺⁺ al mejorar la exposición de la etiqueta his

10E8_T117v2 codificó las siguientes modificaciones en relación con 4E10_T117:

a. Doble mutación: LWWIMDVI -> LWWIKAVI para introducir K683 en el epítipo y reducir el ácido aspártico adyacente a una alanina para minimizar las posibilidades de interacciones de anticuerpos (favorables o desfavorables) mientras se mantiene la preferencia de la estructura secundaria helicoidal local.

Por lo tanto, de todas las construcciones anteriores, las siguientes produjeron proteína soluble:

1. 10E8_T93v2
2. 10E8_T93v2_RT1_1
3. 10E8_T93v2_RT1_2
4. 10E8_T298v2
5. 10E8_T117v2

Estos andamiajes 10E8, y sus andamiajes 4E10 parentales (también producidos en *E. coli*), se caracterizan por SECMAIS (dispersión de luz multiángulo acoplada en línea con cromatografía de exclusión de tamaño) para determinar su estado multimérico de solución, y los cinco andamiajes con estado multimérico bien definido se prueban para la unión a 10E8 maduro y de línea germinal.

10E8_T93v2, 10E8_T93v2_RT1_2, 10E8_T298v2 y 10E8_T117v2 son todos monoméricos en solución. 10E8_tet_e es un tetrámero en solución, según lo diseñado. T93v2_RT1_1 es una mezcla de monómero y dímero en solución, por lo que no se busca más. El hecho de que 10E8_T117v2 y 10E8_T298v2 sean monómeros es un gran avance porque sus andamiajes principales (4E10_T117 y 4E10_T298) formaron dímeros en solución que enterraron el epítipo en la interfaz del dímero. La estabilidad térmica de 10E8_T93v2_RT1_2 y 10E8_T298v2 también se evalúa mediante espectrometría de dicroísmo circular (CD); ambos andamiajes son tan estables que se establece un límite inferior en las temperaturas de fusión de > 90 °C. Nuevamente, esta fue una mejora importante en los andamiajes parentales que tenían temperaturas de fusión de 79 °C (4E10_T93) y 48 °C (4E10_T298).

Sorprendentemente, cinco andamiajes 10E8 se unen al 10E8 maduro, y dos andamiajes 10E8 se unen con afinidad detectable a la línea germinal 10E8. Las afinidades por el 10E8 maduro fueron particularmente altas para T117v2 ($K_d = 91$ pM) y T298v2 ($K_d = 172$ pM). Las afinidades para T93v2 ($K_d \sim 5$ nM pero la cinética SPR es difícil de ajustar) y T93v2_RT1_2 ($K_d = 800$ pM) son más bajas que para T117v2 y T298v2 pero aún son considerablemente mejores que el valor informado para la unión de 10E8 maduro al péptido ($K_d \sim 20$ nM). También se observa que 10E8_tet2_e se une fuertemente, pero la cinética SPR no pudo ajustarse debido a la avidéz multivalente en la interacción entre el tetrámero y la superficie del sensor recubierta con anticuerpo 10E8. T93v2_RT1_1 no se prueba para la unión de 10E8 porque no es un monómero homogéneo en solución. Para la línea germinal 10E8, los andamiajes T117v2 (K_d (10E8GL) ~ 30 mM) y T298v2 (K_d (10E8GL) = 105 mM) tienen afinidades medibles, pero los otros andamiajes no.

Por el contrario, solo dos de los cinco andamiajes 4E10 parentales tienen afinidad detectable por 10E8, tanto 4E10_T117 como 4E10_T298 unen 10E8 con $K_d = 3$ nM, considerablemente más débil (por un factor de ~ 30) que los andamiajes 10E8 correspondientes. Y ninguno de los andamiajes 4E10 parentales tienen afinidad detectable por la línea germinal 10E8.

Por lo tanto, las mutaciones modificadas en los andamiajes 4E10 parentales confieren un beneficio inesperado de una unión fuerte al 10E8 maduro y, en dos casos, una unión débil a la línea germinal 10E8. Estos andamiajes 10E8 ahora están habilitados como inmunógenos 10E8.

El VIH incluye una variación sustancial de la secuencia en posiciones expuestas dentro y alrededor de los residuos de contacto 10E8. Para referencia a los residuos expuestos en y alrededor del epítipo 10E8.

La Figura 1 muestra una parte de la estructura del anticuerpo 10E8 unido a un péptido de VIH. Los aminoácidos del VIH que interactúan directamente con 10E8 o que están expuestos alrededor de las posiciones de contacto de 10E8 se muestran en la representación de relleno o barra. Esos residuos en el relleno espacial están altamente conservados en VIH ($> 99\%$), mientras que los residuos en barra son más variables.

Tabla 1. Segmentos de secuencia del VIH sobre las posiciones 671-683, clasificadas por frecuencia de ocurrencia.

Se muestran los 100 segmentos más comunes. Las posiciones de secuencia indicadas con una estrella son posiciones que se incluyen en andamiajes 10E8. Las posiciones en negrita son aquellas con una variación sustancial de la secuencia. Se utilizaron un total de 2870 secuencias de VIH de todos los clados para este análisis.

Rango	% de secuencias	% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
1	0,0997	0,0997	NWFDITNWLWYIK
2	0,0760	0,1757	NWFDITKWLWYIK
3	0,0617	0,2374	NWFDISNWLWYIK
4	0,0495	0,2869	NWFSITKWLWYIK
5	0,0352	0,3221	NWFNITNWLWYIK
6	0,0335	0,3556	NWFSITNWLWYIK
7	0,0275	0,3831	SWFDITNWLWYIK
8	0,0254	0,4085	NWFDISNWLWYIR
9	0,0254	0,4339	NWFDISKWLWYIK
10	0,0223	0,4562	SWFDISNWLWYIK
11	0,0216	0,4778	NWFNISNWLWYIK
12	0,0178	0,4956	NWFSITNWLWYIR
13	0,0160	0,5116	NWFDITNWLWYIR
14	0,0157	0,5273	SWFSITNWLWYIK
15	0,0153	0,5426	NWFDITRWLWYIK
16	0,0132	0,5558	SWFDISNWLWYIR
17	0,0129	0,5687	NWFSISNWLWYIK
18	0,0122	0,5809	TWFDITNWLWYIK
19	0,0122	0,5931	TWFDISNWLWYIK
20	0,0122	0,6053	NWLDITKWLWYIK
21	0,0115	0,6168	NWFDITSWLWYIK

ES 2 807 173 T3

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
22	0,0115	0,6283	NWFDITQWLWYIK
23	0,0108	0,6391	SWFSITNWLWYIR
24	0,0101	0,6492	SWFDITKWLWYIK
25	0,0094	0,6586	SWFDITNWLWYIR
26	0,0094	0,668	NWFDISKWLWYIR
27	0,0091	0,6771	NWFNITQWLWYIK
28	0,0087	0,6858	NWFSISNWLWYIR
29	0,0087	0,6945	NWFGITKWLWYIK
30	0,0084	0,7029	NWFSITQWLWYIK
31	0,0084	0,7113	NWFDISRWLWYIK
32	0,0077	0,719	SWFNITNWLWYIR
33	0,0073	0,7263	TWFDISNWLWYIR
34	0,0073	0,7336	NWFNITKWLWYIK
35	0,0070	0,7406	TWFDITKWLWYIK
36	0,0066	0,7472	SWFNITNWLWYIK
37	0,0066	0,7538	SWFNISNWLWYIK
38	0,0063	0,7601	NWFNISNWLWYIR
39	0,0059	0,766	NWFSISKWLWYIK
40	0,0059	0,7719	NWFNITNWLWYIR
41	0,0059	0,7778	NWFDITKWLWYIR
42	0,0056	0,7834	SWFSITKWLWYIK
43	0,0052	0,7886	NWFTITNWLWYIK
44	0,0049	0,7935	SWFSISNWLWYIR
45	0,0042	0,7977	NWFDITHWLWYIK
46	0,0038	0,8015	SWFDITQWLWYIK
47	0,0038	0,8053	NWFSITHWLWYIK
48	0,0035	0,8088	TWFDITNWLWYIR
49	0,0031	0,8119	SWFNISNWLWYIR
50	0,0031	0,815	SWFDITKWLWYIR
51	0,0031	0,8181	NWFGITNWLWYIK
52	0,0031	0,8212	NWFDISRWLWYIR
53	0,0031	0,8243	NWFDISHWLWYIK
54	0,0028	0,8271	NWFNISKWLWYIK
55	0,0028	0,8299	NWFDITQWLWYIR
56	0,0024	0,8323	SWFSISNWLWYIK
57	0,0024	0,8347	SWFSISKWLWYIK
58	0,0024	0,8371	NWFDISSWLWYIK
59	0,0021	0,8392	SWLDITKWLWYIK
60	0,0021	0,8413	SWFSITQWLWYIK
61	0,0021	0,8434	SWFDISKWLWYIR

ES 2 807 173 T3

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
62	0,0021	0,8455	SWFDISKWLWYIK
63	0,0021	0,8476	NWFSISQWLWYIK
64	0,0021	0,8497	NWFEISNWLWYIK
65	0,0021	0,8518	NWFDITSWLWYIR
66	0,0017	0,8535	SWFDITRWLWYIK
67	0,0017	0,8552	NWFTISNWLWYIK
68	0,0017	0,8569	NWFEISKWLWYIK
69	0,0017	0,8586	NWFDISQWLWYIK
70	0,0014	0,86	TWFGITNWLWYIR
71	0,0014	0,8614	TWFDITKWLWYIR
72	0,0014	0,8628	SWFTITNWLWYIK
73	0,0014	0,8642	SWFDISSWLWYIR
74	0,0014	0,8656	SWFDISRWLWYIK
75	0,0014	0,867	NWFSITKWLWYIR
76	0,0014	0,8684	NWFNITHWLWYIK
77	0,0014	0,8698	NWFGISNWLWYIK
78	0,0014	0,8712	NWFDISSWLWYIR
79	0,0010	0,8722	TWFNISNWLWYIK
80	0,0010	0,8732	TWFDITRWLWYIK
81	0,0010	0,8742	TWFDITQWLWYIK
82	0,0010	0,8752	TWFDISHWLWYIK
83	0,0010	0,8762	SWFSITQWLWYIR
84	0,0010	0,8772	SWFSITHWLWYIK
85	0,0010	0,8782	SWFSISQWLWYIK
86	0,0010	0,8792	SWFNITQWLWYIK
87	0,0010	0,8802	SWFNITHWLWYIK
88	0,0010	0,8812	SWFEITNWLWYIK
89	0,0010	0,8822	SWFEISNWLWYIR
90	0,0010	0,8832	SWFDITSWLWYIR
91	0,0010	0,8842	SWFDISQWLWYIK
92	0,0010	0,8852	NWFXITNWLWYIK
93	0,0010	0,8862	NWFSITSWLWYIK
94	0,0010	0,8872	NWFSITRWLWYIK
95	0,0010	0,8882	NWFSITKWLRYIQ
96	0,0010	0,8892	NWFSITHWLWYIR
97	0,0010	0,8902	NWFSISRWLWYIK
98	0,0010	0,8912	NWFNITRWLWYIK
99	0,0010	0,8922	NWFNITEWLWYIK
100	0,0010	0,8932	NWFNISQWLWYIK

Tabla 2. Segmentos de secuencia del clado C de VIH sobre las posiciones 671-683, clasificadas por frecuencia de ocurrencia. Se muestran los 100 segmentos del clado C más comunes. Las posiciones de secuencia indicadas con una estrella son posiciones que se incluyen en andamiajes 10E8. Las posiciones en negrita son aquellas con una variación sustancial de secuencia. Se utilizaron un total de 739 secuencias del clado C del VIH para este análisis.

Rango	% de secuencias	% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
1	0,0785	0,0785	NWFSITKWLWYIK
2	0,0690	0,1475	NWFDITNWLWYIK
3	0,0568	0,2043	NWFDITKWLWYIK
4	0,0501	0,2544	NWFNITNWLWYIK
5	0,0419	0,2963	NWFSITNWLWYIK
6	0,0338	0,3301	NWFNISNWLWYIK
7	0,0311	0,3612	SWFSITNWLWYIK
8	0,0298	0,391	SWFDISNWLWYIK
9	0,0284	0,4194	NWFDISNWLWYIK
10	0,0244	0,4438	SWFDITNWLWYIK
11	0,0217	0,4655	SWFNITNWLWYIR
12	0,0189	0,4844	NWFGITKWLWYIK
13	0,0176	0,502	SWFNITNWLWYIK
14	0,0176	0,5196	SWFNISNWLWYIK
15	0,0176	0,5372	NWFDISKWLWYIK
16	0,0162	0,5534	SWFSITKWLWYIK
17	0,0162	0,5696	SWFDISNWLWYIR
18	0,0149	0,5845	SWFSITNWLWYIR
19	0,0149	0,5994	NWFSISNWLWYIK
20	0,0135	0,6129	SWFDITNWLWYIR
21	0,0122	0,6251	SWFDITKWLWYIK
22	0,0122	0,6373	NWFSITNWLWYIR
23	0,0108	0,6481	TWFDITNWLWYIK
24	0,0108	0,6589	NWFDITNWLWYIR
25	0,0095	0,6684	NWFNITNWLWYIR
26	0,0095	0,6779	NWFNITKWLWYIK
27	0,0095	0,6874	NWFDISNWLWYIR
28	0,0081	0,6955	TWFDITKWLWYIK
29	0,0081	0,7036	TWFDISNWLWYIK
30	0,0081	0,7117	SWFSISNWLWYIR
31	0,0081	0,7198	NWFNISNWLWYIR
32	0,0081	0,7279	NWFDITRWLWYIK
33	0,0068	0,7347	SWFSISKWLWYIK
34	0,0068	0,7415	SWFNISNWLWYIR
35	0,0054	0,7469	NWFSISKWLWYIK
36	0,0054	0,7523	NWFNITQWLWYIK
37	0,0054	0,7577	NWFDITSWLWYIK
38	0,0054	0,7631	NWFDISRWLWYIK

ES 2 807 173 T3

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
39	0,0041	0,7672	TWFDITNWLWYIR
40	0,0041	0,7713	SWFDISRWLWYIK
41	0,0041	0,7754	NWFSITQWLWYIK
42	0,0041	0,7795	NWFSISNWLWYIR
43	0,0041	0,7836	NWFNISKWLWYIK
44	0,0041	0,7877	NWFGITNWLWYIK
45	0,0041	0,7918	NWFDITQWLWYIK
46	0,0041	0,7959	NWFDITKWLWYIR
47	0,0041	0,8	NWFDISKWLWYIR
48	0,0041	0,8041	DWFNISNWLWYIK
49	0,0027	0,8068	TWFGITNWLWYIR
50	0,0027	0,8095	TWFGITNWLWYIK
51	0,0027	0,8122	TWFDISNWLWYIR
52	0,0027	0,8149	SWFSISSWLWYIK
53	0,0027	0,8176	SWFSISQWLWYIK
54	0,0027	0,8203	SWFSISNWLWYIK
55	0,0027	0,823	SWFSISHWLWYIK
56	0,0027	0,8257	SWFDITSWLWYIR
57	0,0027	0,8284	SWFDITRWLWYIR
58	0,0027	0,8311	SWFDITQWLWYIK
59	0,0027	0,8338	SWFDITKWLWYIR
60	0,0027	0,8365	SWFDISSWLWYIR
61	0,0027	0,8392	NWFSITHWLWYIR
62	0,0027	0,8419	NWFKITKWLWYIK
63	0,0027	0,8446	NWFDITHWLWYIK
64	0,0027	0,8473	NWFDISRWLWYIR
65	0,0027	0,85	NWFDISKWLGYIQ
66	0,0027	0,8527	DWFSISNWLWYIK
67	0,0014	0,8541	TWFSLTNWLWYIR
68	0,0014	0,8555	TWFSITNWLWYIR
69	0,0014	0,8569	TWFSITNWLWYIK
70	0,0014	0,8583	TWFSISNWLWYIR
71	0,0014	0,8597	TWFSISNWLWYIK
72	0,0014	0,8611	TWFGISSWLWYIK
73	0,0014	0,8625	TWFGISNWLWYIK
74	0,0014	0,8639	TWFDITRWLWYIK
75	0,0014	0,8653	TWFDITKWPWYIK
76	0,0014	0,8667	TWFDISSWLWYIR
77	0,0014	0,8681	TWFDISKWLWYIR
78	0,0014	0,8695	TWFDISHWLWYIK

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
79	0,0014	0,8709	SWWDISKWLWYIR
80	0,0014	0,8723	SWVDISNWLWYIK
81	0,0014	0,8737	SWLSITNWLWYIR
82	0,0014	0,8751	SWLSISNWLWYIK
83	0,0014	0,8765	SWFTLSNWLWYIR
84	0,0014	0,8779	SWFTITNWLWYIK
85	0,0014	0,8793	SWFTITKWLWYIK
86	0,0014	0,8807	SWFTISNWLWYIR
87	0,0014	0,8821	SWFSITQWLWYIK
88	0,0014	0,8835	SWFSITKWLRYIQ
89	0,0014	0,8849	SWFSITHWLWYIR
90	0,0014	0,8863	SWFNMTNWLWYIK
91	0,0014	0,8877	SWFNITQWLWYIK
92	0,0014	0,8891	SWFNITNWLWCIC
93	0,0014	0,8905	SWFNITNWLW-1K
94	0,0014	0,8919	SWFNITKWLWYIK
95	0,0014	0,8933	SWFNITHWLWYIK
96	0,0014	0,8947	SWFNISNWLWYIR
97	0,0014	0,8961	SWFNISKWLWYIK
98	0,0014	0,8975	SWFNISHWLWYIR
99	0,0014	0,8989	SWFHITNWLWYIK
100	0,0014	0,9003	SWFGITQWLWYIK

Tabla 3. Segmentos de secuencia del clado B del VIH sobre las posiciones 671-683, clasificadas por frecuencia de ocurrencia. Se muestran los 100 segmentos del clado B más comunes. Las posiciones de secuencia indicadas con una estrella son posiciones que se incluyen en andamiajes 10E8. Las posiciones en negrita son aquellas con una variación sustancial de secuencia. Se utilizaron un total de 898 secuencias del clado B del VIH para este análisis.

Rango	% de secuencias	% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
1	0,1459	0,1459	NWFDITNWLWYIK
2	0,1147	0,2606	NWFDITKWLWYIK
3	0,0668	0,3274	NWFDISNWLWYIK
4	0,0434	0,3708	NWFSIBWLWYIK
5	0,0379	0,4087	NWFNITNWLWYIK
6	0,0356	0,4443	NWFSITKWLWYIK
7	0,0301	0,4744	SWFDITNWLWYIK
8	0,0256	0,5	NWFDISKWLWYIK
9	0,0223	0,5223	NWFSITNWLWYIR
10	0,0223	0,5446	NWFDITQWLWYIK
11	0,0212	0,5658	NWFDITNWLWYIR
12	0,0178	0,5836	NWFDISNWLWYIR
13	0,0167	0,6003	SWFDISNWLWYIK
14	0,0156	0,6159	NWFNISNWLWYIK

ES 2 807 173 T3

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
15	0,0145	0,6304	SWFSITNWLWYIR
16	0,0145	0,6449	NWFNITQWLWYIK
17	0,0134	0,6583	TWFDITNWLWYIK
18	0,0134	0,6717	NWFDITSWLWYIK
19	0,0122	0,6839	NWFSISNWLWYIK
20	0,0100	0,6939	SWFDITKWLWYIK
21	0,0100	0,7039	SWFDISNWLWYIR
22	0,0100	0,7139	NWFTITNWLWYIK
23	0,0100	0,7239	NWFSISNWLWYIR
24	0,0089	0,7328	SWFSITNWLWYIK
25	0,0089	0,7417	SWFDITNWLWYIR
26	0,0089	0,7506	NWFSITQWLWYIK
27	0,0089	0,7595	NWFSITHWLWYIK
28	0,0089	0,7684	NWFDITHWLWYIK
29	0,0067	0,7751	TWFDITNWLWYIR
30	0,0067	0,7818	SWFDITQWLWYIK
31	0,0067	0,7885	NWFDITRWLWYIK
32	0,0056	0,7941	TWFDISNWLWYIR
33	0,0056	0,7997	NWFDITQWLWYIR
34	0,0056	0,8053	NWFDISKWLWYIR
35	0,0045	0,8098	TWFDISNWLWYIK
36	0,0045	0,8143	SWFSITQWLWYIK
37	0,0045	0,8188	NWFTISNWLWYIK
38	0,0045	0,8233	NWFNITKWLWYIK
39	0,0045	0,8278	NWFDITKWLWYIR
40	0,0033	0,8311	TWFDITKWLWYIK
41	0,0033	0,8344	SWFDISQWLWYIK
42	0,0033	0,8377	NWFSITSWLWYIK
43	0,0033	0,841	NWFSISQWLWYIK
44	0,0033	0,8443	NWFSISKWLWYIK
45	0,0033	0,8476	NWFNITNWLWYIR
46	0,0033	0,8509	NWFDISSWLWYIK
47	0,0033	0,8542	NWFDISQWLWYIK
48	0,0022	0,8564	SWFSITQWLWYIR
49	0,0022	0,8586	SWFSITHWLWYIK
50	0,0022	0,8608	SWFSISNWLWYIK
51	0,0022	0,863	SWFNISNWLWYIK
52	0,0022	0,8652	SWFDITSWLWYIK
53	0,0022	0,8674	SWFDITKWLWYIR
54	0,0022	0,8696	SWFDISKWLWYIK

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
55	0,0022	0,8718	NWFXITNWLWYIK
56	0,0022	0,874	NWFNITHWLWYIK
57	0,0022	0,8762	NWFNITEWLWYIK
58	0,0022	0,8784	NWFGITKWLWYIK
59	0,0022	0,8806	NWFEISNWLWYIK
60	0,0022	0,8828	NWFDITHWLWYIR
61	0,0022	0,885	NWFDISRWLWYIK
62	0,0022	0,8872	DWFSITKWLWYIK
63	0,0011	0,8883	TWFSITNWLWYIK
64	0,0011	0,8894	TWFNITNWLWYIR
65	0,0011	0,8905	TWFNISNWLWYIK
66	0,0011	0,8916	TWFGLNKWMRYIK
67	0,0011	0,8927	TWFGITNWLWYIR
68	0,0011	0,8938	TWFDLTNWLWYIR
69	0,0011	0,8949	TWFDITQWLWYIK
70	0,0011	0,896	TWFDITKWLWYIR
71	0,0011	0,8971	TWFDISNWMRYIQ
72	0,0011	0,8982	TWFDISKWLWYIK
73	0,0011	0,8993	SXFSITNWLWYIR
74	0,0011	0,9004	SWYDISNWLWYIK
75	0,0011	0,9015	SWLDITNWLWYIR
76	0,0011	0,9026	SWLDITKWLWYIK
77	0,0011	0,9037	SWLDISNWLKYIK
78	0,0011	0,9048	SWLDISNWLGYIK
79	0,0011	0,9059	SWLDISHWLWYIR
80	0,0011	0,907	SWFTITNWLWYIK
81	0,0011	0,9081	SWFTISKWLWYIK
82	0,0011	0,9092	SWFSLTNWLWYIK
83	0,0011	0,9103	SWFSIVNWLWYIK
84	0,0011	0,9114	SWFSITNWLRYIK
85	0,0011	0,9125	SWFSITKWLWYIK
86	0,0011	0,9136	SWFSITEWLWYIK
87	0,0011	0,9147	SWFSISNWLWYIR
88	0,0011	0,9158	SWFQLSKWMWYIK
89	0,0011	0,9169	SWFNITNWLWYIR
90	0,0011	0,918	SWFNITNWLWYIK
91	0,0011	0,9191	SWFNITHWLWYIK
92	0,0011	0,9202	SWFNISNWLWYIR
93	0,0011	0,9213	SWFGITQWLWYIK
94	0,0011	0,9224	SWFEITNWLWYIK

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
95	0,0011	0,9235	SWFEISNWLWYIK
96	0,0011	0,9246	SWFDLTNWLWYIR
97	0,0011	0,9257	SWFDITSWLWYIR
98	0,0011	0,9268	SWFDITRWMKYVK
99	0,0011	0,9279	SWFDITNWLWYIQ
100	0,0011	0,929	SWFDISNWLRYIR

Tabla 4. Segmentos de secuencia del VIH sobre las posiciones 671-683, de clados distintos de B o C, clasificados por frecuencia de ocurrencia. Se muestran los 100 segmentos más comunes. Un total de 1637 secuencias del VIH de clados distintos de B o C se utilizaron para este análisis.

5

Rango	% de secuencias	% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
1	0,0844	0,0844	NWFDITNWLWYIK
2	0,0779	0,1623	NWFDISNWLWYIK
3	0,0593	0,2216	NWFDITKWLWYIK
4	0,0422	0,2638	NWFSITKWLWYIK
5	0,0406	0,3044	NWFDISNWLWYIR
6	0,0300	0,3344	NWFDISKWLWYIK
7	0,0284	0,3628	NWLDITKWLWYIK
8	0,0276	0,3904	SWFDITNWLWYIK
9	0,0260	0,4164	NWFDITRWLWYIK
10	0,0244	0,4408	NWFNITNWLWYIK
11	0,0219	0,4627	SWFDISNWLWYIK
12	0,0211	0,4838	NWFSITNWLWYIK
13	0,0203	0,5041	TWFDISNWLWYIK
14	0,0187	0,5228	NWFNISNWLWYIK
15	0,0179	0,5407	NWFSITNWLWYIR
16	0,0154	0,5561	NWFDITNWLWYIR
17	0,0154	0,5715	NWFDISKWLWYIR
18	0,0146	0,5861	NWFDISRWLWYIK
19	0,0138	0,5999	SWFDISNWLWYIR
20	0,0138	0,6137	NWFDITSWLWYIK
21	0,0122	0,6259	TWFDITNWLWYIK
22	0,0122	0,6381	NWFSISNWLWYIK
23	0,0114	0,6495	TWFDISNWLWYIR
24	0,0114	0,6609	SWFSITNWLWYIK
25	0,0106	0,6715	NWFSITQWLWYIK
26	0,0106	0,6821	NWFSISNWLWYIR
27	0,0089	0,691	TWFDITKWLWYIK
28	0,0089	0,6999	SWFDITKWLWYIK
29	0,0089	0,7088	NWFNISNWLWYIR
30	0,0081	0,7169	NWFSISKWLWYIK

ES 2 807 173 T3

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
31	0,0081	0,725	NWFNITKWLWYIK
32	0,0081	0,7331	NWFDITQWLWYIK
33	0,0081	0,7412	NWFDITKWLWYIR
34	0,0073	0,7485	SWFDITNWLWYIR
35	0,0073	0,7558	NWFNITQWLWYIK
36	0,0073	0,7631	NWFGITKWLWYIK
37	0,0065	0,7696	NWFDISHWLWYIK
38	0,0057	0,7753	SWFSITNWLWYIR
39	0,0057	0,781	SWFSISNWLWYIR
40	0,0057	0,7867	NWFNITNWLWYIR
41	0,0049	0,7916	NWFTITNWLWYIK
42	0,0049	0,7965	NWFGITNWLWYIK
43	0,0049	0,8014	NWFDISRWLWYIR
44	0,0041	0,8055	SWLDITKWLWYIK
45	0,0041	0,8096	SWFNITNWLWYIR
46	0,0041	0,8137	SWFNITNWLWYIK
47	0,0041	0,8178	SWFDITKWLWYIR
48	0,0041	0,8219	NWFEISKWLWYIK
49	0,0041	0,826	NWFDITSWLWYIR
50	0,0032	0,8292	SWFNISNWLWYIK
51	0,0032	0,8324	SWFDITRWLWYIK
52	0,0032	0,8356	SWFDISKWLWYIR
53	0,0032	0,8388	SWFDISKWLWYIK
54	0,0032	0,842	NWFNISKWLWYIK
55	0,0024	0,8444	TWFDITKWLWYIR
56	0,0024	0,8468	SWFSITKWLWYIK
57	0,0024	0,8492	SWFSISNWLWYIK
58	0,0024	0,8516	SWFNISNWLWYIR
59	0,0024	0,854	SWFEISNWLWYIR
60	0,0024	0,8564	SWFDITQWLWYIK
61	0,0024	0,8588	NWFSISQWLWYIK
62	0,0024	0,8612	NWFNISQWLWYIK
63	0,0024	0,8636	NWFGISNWLWYIK
64	0,0024	0,866	NWFEISNWLWYIK
65	0,0024	0,8684	NWFDISSWLWYIR
66	0,0024	0,8708	NWFDISSWLWYIK
67	0,0016	0,8724	TWFNISNWLWYIK
68	0,0016	0,874	TWFDITRWLWYIK
69	0,0016	0,8756	TWFDITQWLWYIK
70	0,0016	0,8772	TWFDITHWLWYIR

Rango	% de secuencias	(continuación)	
		% acumulado	Secuencia del VIH 671-683
71	0,0016	0,8788	TWFDISHWLWYIK
72	0,0016	0,8804	SWFTITNWLWYIK
73	0,0016	0,882	SWFSISKWLWYIK
74	0,0016	0,8836	SWFNITQWLWYIK
75	0,0016	0,8852	SWFGITNWLWYIR
76	0,0016	0,8868	SWFDISSWLWYIR
77	0,0016	0,8884	SWFDIRSWLWYIR
78	0,0016	0,89	NWFTITNWLWYIR
79	0,0016	0,8916	NWFSITRWLWYIK
80	0,0016	0,8932	NWFSITKWLWYIR
81	0,0016	0,8948	NWFSITHWLWYIK
82	0,0016	0,8964	NWFSISSWLWYIK
83	0,0016	0,898	NWFSISRWLWYIK
84	0,0016	0,8996	NWFNITSWLWYIK
85	0,0016	0,9012	NWFNISKWLWYIR
86	0,0016	0,9028	NWFDITQWLWYIR
87	0,0016	0,9044	NWFDITHWLWYIK
88	0,0016	0,906	NWFDISHWLWYIR
89	0,0016	0,9076	DWLDITKWLWYIK
90	0,0016	0,9092	DWFDITSWLWYIR
91	0,0008	0,91	XWFDISRWLWYIK
92	0,0008	0,9108	TWFSISNWLWYIR
93	0,0008	0,9116	TWFNITQWLWYIK
94	0,0008	0,9124	TWFGITNWLWYIR
95	0,0008	0,9132	TWFGISNWLWYIR
96	0,0008	0,914	TWFDLTNWLWYIK
97	0,0008	0,9148	TWFDLSNWLWYIK
98	0,0008	0,9156	TWFDITNWLWYIR
99	0,0008	0,9164	TWFDITHWLWYIK
100	0,0008	0,9172	TWFDISSWLWYIK

Tabla 5. Frecuencias específicas de la posición de los aminoácidos más comunes en las posiciones del VIH incluidas en los andamiajes 10E8. Las frecuencias se muestran para el número mínimo de aminoácidos comunes para los cuales la suma de frecuencias es mayor al 90%. Las frecuencias se muestran calculadas en diferentes conjuntos de secuencias del VIH, incluidos: todos los clados, clado C, clado B, y todos los clados que no sean B o C. Los aminoácidos en estas posiciones están expuestos en la superficie de los andamiajes 10E8.

Posición	Todos los clados	Clado C	Clado B	Sin B o C
671	N (0,72), S (0,21)	N (0,61), S (0,32)	N (0,78), S (0,17)	N (0,74), S (0,18)
672	W (0,997)	W (0,997)	W (0,997)	W (0,998)
673	F (0,976)	F (0,989)	F (0,999)	F (0,958)
674	D (0,59), S (0,22), N (0,13)	D (0,42), S (0,29), N (0,21)	D (0,64), S (0,21), N (0,1)	D (0,66), S (0,18), N (0,11)

(continuación)

Posición	Todos los clados	Clado C	Clado B	Sin B o C
676	T (0,65), S (0,34)	T (0,68), S (0,32)	T (0,73), S (0,27)	T (0,58), S (0,41)
677	N (0,57), K (0,27), Q (0,05), R (0,04)	N (0,60), K (0,29), Q (0,03), R (0,03)	N (0,59), K (0,24) Q (0,09), H (0,04), R (0,01)	N (0,55), K (0,28) Q (0,05), R (0,06)
679	L (0,997)	L (0,997)	L (0,992)	L (0,998)
680	W (0,989)	W (0,984)	W (0,987)	W (0,994)
682	1 (0,996)	1 (0,996)	1 (0,996)	1 (0,997)
683	K (0,78), R (0,21)	K (0,77),R (0,22)	K (0,82),R (0,17)	K (0,75),R (0,24)

5 Tabla 6. Frecuencias específicas de posición de los aminoácidos del VIH en cócteles de 3 mer y 5 mer de andamiajes 10E8. Los cócteles fueron diseñados para aproximar las frecuencias del VIH de los aminoácidos más comunes en cada posición del epítipo para la cual la suma de las frecuencias individuales es mayor al 90%. Los aminoácidos en estas posiciones están expuestos en la superficie de los andamiajes 10E8.

Posición	Cóctel de 3 mer	Cóctel de 5 mer
671	N (0,67), S (0,33)	N (0,80), S (0,20)
672	W (1,0)	W (1,0)
673	F (1,0)	F (1,0)
674	D (0,33), S (0,33), N (0,33)	D (0,60), S (0,20), N (0,20)
676	T (0,67), S (0,33)	T (0,60), S (0,40)
677	N (0,67), K (0,33)	N (0,40), K (0,20), R (0,20), Q (0,20)
679	L (1,0)	L (1,0)
680	W (1,0)	W (1,0)
682	1 (1,0)	I (1,0)
683	K (0,67), R (0,33)	K (0,80), R (0,20)

10 Tabla 7. Cobertura teórica de la variación de la secuencia del VIH específica de posición en todos los clados por cócteles de andamiaje de 3 mer y 5 mer. En el presente documento la cobertura en cada posición se define como la suma de las frecuencias de los aminoácidos incluidos en el cóctel en esa posición. La cobertura total, definida como el producto de las coberturas específicas de posición, se enumera en la parte inferior.

Posición	Cóctel de 3 mer		Cóctel de 5 mer	
	Todos los clados	Clado C	Todos los clados	Clado C
671	0,93	0,93	0,93	0,93
672	1,00	1,00	1,00	1,00
673	0,98	0,99	0,98	0,99
674	0,94	0,92	0,94	0,95
676	0,99	1,00	0,99	1,00
677	0,84	0,89	0,93	0,95
679	1,00	1,00	1,00	1,00
680	0,99	0,98	0,99	0,98
682	1,00	1,00	1,00	1,00
683	0,99	0,99	0,99	0,99
Total	0,70	0,73	0,77	0,80

15 Tabla 8. Cócteles de tres cadenas de secuencia (cdn1, cdn2, cdn3) en las que cada cadena representa una combinación natural de aminoácidos del VIH en las posiciones del VIH 671, 674, 676, 677 y 683, junto con la frecuencia de ocurrencia (f1, f2, f3) de esa combinación en secuencias del VIH. Los 71 cócteles enumerados son aquellos que se aproximan mejor a las distribuciones de frecuencia de aminoácidos del VIH en esas posiciones y

ES 2 807 173 T3

que también proporcionan una cobertura óptima de la variación de la secuencia del VIH en cada posición, como se discute en el texto.

	cdn1	cdn2	cdn3	f1	f2	f3	f1 + f2 + f3
1	NDTNK	NSTKK	SNSNR	0,101	0,051	0,003	0,155
2	NDTKK	NNTNK	SSSNR	0,091	0,036	0,005	0,132
3	NDTKK	NSTNK	SNSNR	0,091	0,034	0,003	0,128
4	NDTKK	NNSNK	SSTNR	0,091	0,022	0,012	0,125
5	NDSNK	NSTKK	SNTNR	0,063	0,051	0,008	0,122
6	NDTNK	NSTNR	SNSKK	0,101	0,018	0,001	0,12
7	NDTNK	SSTNK	NNSKR	0,101	0,016	0,001	0,118
8	NDTNK	SSTNR	NNSKK	0,101	0,012	0,003	0,116
9	NDTKK	NSTNR	SNSNK	0,091	0,018	0,007	0,116
10	NDTNK	SNTNR	NSSKK	0,101	0,008	0,006	0,115
11	NDTNK	NNTKK	SSSNR	0,101	0,007	0,005	0,113
12	NDTNK	NNSNR	SSTKK	0,101	0,006	0,006	0,113
13	NDTKK	SSTNK	NNSNR	0,091	0,016	0,006	0,113
14	NDTKK	NSSNK	SNTNR	0,091	0,013	0,008	0,112
15	NDTNK	NSSNR	SNTKK	0,101	0,009	0,001	0,111
16	NDTNK	SNTNK	NSSKR	0,101	0,008	0,001	0,11
17	NDTNK	SNSNK	NSTKR	0,101	0,007	0,001	0,109
18	NDTNK	NNTNR	SSSKK	0,101	0,006	0,002	0,109
19	NDTKK	NSSNR	SNTNK	0,091	0,009	0,008	0,108
20	NSTKK	NNTNK	SDSNR	0,051	0,036	0,014	0,101
21	NDTKK	NNTNR	SSSNK	0,091	0,006	0,003	0,1
22	NSTKK	SDTNK	NNSNR	0,051	0,028	0,006	0,085
23	NSTKK	NDSNR	SNTNK	0,051	0,026	0,008	0,085
24	NSTKK	NNSNK	SDTNR	0,051	0,022	0,010	0,083
25	NDSNK	NSTNR	SNTKK	0,063	0,018	0,001	0,082
26	NDSNK	SSTNR	NNTKK	0,063	0,012	0,007	0,082
27	NSTKK	SDSNK	NNTNR	0,051	0,024	0,006	0,081
28	NDSNK	NNTNR	SSTKK	0,063	0,006	0,006	0,075
29	NSTKK	NDTNR	SNSNK	0,051	0,016	0,007	0,074
30	NNTNK	NDSKK	SSTNR	0,036	0,026	0,012	0,074
31	NDSNK	SNTNK	NSTKR	0,063	0,008	0,001	0,072
32	NNTNK	NSTNK	SDSKR	0,036	0,034	0,002	0,072
33	NNTNK	NDSNR	SSTKK	0,036	0,026	0,006	0,068
34	NSTNK	NDSKK	SNTNR	0,034	0,026	0,008	0,068
35	NNTNK	SDTNK	NSSKR	0,036	0,028	0,001	0,065
36	NSTNK	SDTNK	NNSKR	0,034	0,028	0,001	0,063
37	NNTNK	SSTNK	NDSKR	0,036	0,016	0,010	0,062
38	NNTNK	SDSNK	NSTKR	0,036	0,024	0,001	0,061
39	NSTNK	NDSNR	SNTKK	0,034	0,026	0,001	0,061

(continuación)							
	cdn1	cdn2	cdn3	f1	f2	f3	f1 + f2 + f3
40	NSTNK	NNSNK	SDTKR	0,034	0,022	0,003	0,059
41	NNTNK	SDTKK	NSSNR	0,036	0,013	0,009	0,058
42	NNTNK	NSTNR	SDSKK	0,036	0,018	0,002	0,056
43	NSTNK	SDSNR	NNTKK	0,034	0,014	0,007	0,055
44	NNTNK	NDTNR	SSSKK	0,036	0,016	0,002	0,054
45	NSTNK	SDTKK	NSSNR	0,034	0,013	0,006	0,053
46	NNSNK	NSTNR	SDTKK	0,022	0,018	0,013	0,053
47	NNTNK	NSSNK	SDTKR	0,036	0,013	0,003	0,052
48	NNTNK	SDTNR	NSSKK	0,036	0,010	0,006	0,052
49	NSTNK	NDSKR	SNTNK	0,034	0,010	0,008	0,052
50	NDSKK	NSTNR	SNTNK	0,026	0,018	0,008	0,052
51	NSTNK	NDTNR	SNSKK	0,034	0,016	0,001	0,051
52	SDTNK	NNSNK	NSTKR	0,028	0,022	0,001	0,051
53	SDTNK	NSTNR	NNSKK	0,028	0,018	0,003	0,049
54	NDSNR	SSTNK	NNTKK	0,026	0,016	0,007	0,049
55	SDSNK	NSTNR	NNTKK	0,024	0,018	0,007	0,049
56	NDSKK	SSTNK	NNTNR	0,026	0,016	0,006	0,048
57	NSTNK	SDTNR	NNSKK	0,034	0,010	0,003	0,047
58	NSTNK	SNSNK	NDTKR	0,034	0,007	0,006	0,047
59	NNTNK	NDTKR	SSSNK	0,036	0,006	0,003	0,045
60	SDTNK	NSSNR	NNTKK	0,028	0,009	0,007	0,044
61	NNSNK	NDTNR	SSTKK	0,022	0,016	0,006	0,044
62	NNSNK	SSTNK	NDTKR	0,022	0,016	0,006	0,044
63	NSTNK	NNTNR	SDSKK	0,034	0,006	0,002	0,042
64	SDTNK	NSSKK	NNTNR	0,028	0,006	0,006	0,04
65	SSTNK	NDTNR	NNSKK	0,016	0,016	0,003	0,035
66	NSSNK	SDTKK	NNTNR	0,013	0,013	0,006	0,032
67	NDTNR	NSSNK	SNTKK	0,016	0,013	0,001	0,03
68	NDTNR	SNTNK	NSSKK	0,016	0,008	0,006	0,03
69	NSSNK	SDTNR	NNTKK	0,013	0,010	0,007	0,03
70	NSSNK	SNTNK	NDTKR	0,013	0,008	0,006	0,027
71	NDTNR	NNTKK	SSSNK	0,016	0,007	0,003	0,026

Tabla 9. Estado oligomérico de T93v2RT12 y T117v2 y K_D para 10E8 y 4E10 maduros y de línea germinal							
Andamiaje	PM esperado, kDa	PM medido, kDa	Estado multímero	del K_D 10E8 (pM)	K_D 4E10 (pM)	K_D GL-10E8 (μ M)	K_D GL-4E10 (pM)
T117v2	18,6	27,1	mon/dim	82	167,5	~6	187
T117v2-2	18,6	18,1	mon	$1,3 \times 10^3$	53,8		
T117v2-3	17,5	18,4	mon	~925	526	~8	
T117v2-4	17,5	29,3	mon/dim	590	$3,9 \times 10^3$	8	$3,2 \times 10^3$

(continuación)							
Andamiaje	PM esperado, kDa	PM medido, kDa	Estado del multímero	K _D 10E8 (pM)	K _D 4E10 (pM)	K _D GL-10E8 (μM)	K _D GL-4E10 (pM)
T117v2-5	17,5	21,5	mon/dim	155			
T117v2-1-P2	20,3	30,5/32,2	mon/dim	67		3	540
T117v2-2_P2	20,3	34,8	mon/dim	118	703		
T117v2-3_P2	20,3	24,7	principalmente mon	600			
T117v2-4_P2							
T117v2-5_P2							
T117v2-1_RSF1	18,9	34,2	~dim	50	~100		~100
T117v2- 1_g28_g91012	18,6	35,9	dim	180	490		500
T93v2RT12-1	14,9	15,4	mon	40	18	290-720	
T93v2RT12-2	14,9	14,2	mon	20	14		
T93v2RT12-3	14,9	15,5	mon	110	580		
T93v2RT12-4	14,9	14,3	mon	2,7 x 10 ³			
T93v2RT12-5	14,9	13,6	mon	22			
T93v2RT12-1-P2	16,5	15,1	mon	27		290-730	
T93v2RT12-2-P2	16,5	31	dim	430		0,34-0,4	
T93v2RT12-3-P2	16,5	15,7/14,9	mon	130			
T93v2RT12-4-P2	16,5	32,3	dim				
T93v2RT12-5-P2	16,5	28,1	~dim				

Las tablas 1, 2, 3, 4 y 5 documentan la variación de la secuencia del VIH en las posiciones en y alrededor de los residuos de contacto de 10E8. Como se muestra en la Tabla 1, considerando las secuencias de VIH de todos los clados, la variante de secuencia más común ocurre con una frecuencia de solo 10%. Existe una situación similar si se consideran solo secuencias dentro del clado C (Tabla 2), dentro del clado B (Tabla 3), o dentro de secuencias de clados distintos de B o C (Tabla 4). Por lo tanto, la inmunización con un inmunógeno que presenta solo esa secuencia podría inducir reactividad solo al 10% o menos de las cepas de VIH. Las frecuencias de aminoácidos específicas de posición se dan en la Tabla 5 para el menor número de aminoácidos más comunes en cada posición para la cual la suma de las frecuencias es mayor al 90%.

La Figura 2 muestra modelos para los andamiajes T93v2RT12-1 y T117v2-1 en comparación con el péptido del epítipo 10E8 que abarca los residuos del VIH 671-683. Los aminoácidos del VIH que interactúan directamente con 10E8 o que están expuestos alrededor de las posiciones de contacto de 10E8 se muestran en la representación de relleno o barra. Esos residuos en el relleno espacial están altamente conservados en VIH (> 99%), mientras que los residuos en barra son más variables.

Para inducir anticuerpos que puedan reconocer la diversidad de secuencias de VIH dentro del epítipo 10E8, los solicitantes idearon variantes de los andamiajes T93v2RT12 y T117v2 que contienen diferentes variantes del epítipo. Las secuencias de estas variantes se enumeran a continuación, con los residuos del epítipo 10E8 en negrita. En cada caso, una etiqueta his adicional (LEHHHHHH) estaba presente en el terminal C para la purificación. Todas estas variantes se han expresado en *E. coli* y se han purificado, y las proteínas resultantes muestran una alta afinidad por el anticuerpo 10E8 medido por resonancia de plasmón superficial. Las variantes T117v2 también tienen una afinidad modesta por un precursor de línea germinal predicho para 10E8 (denominado simplemente "10E8 de línea germinal"). El estado oligomérico y las constantes de disociación para 10E8, 10E8 de línea germinal, así como el anticuerpo 4E10 y 4E10 de línea germinal, se presentan en la Tabla 9 (respecto a los residuos del epítipo, los solicitantes observan que, en el caso de T93v2RT12, un residuo valina (V) se ha empleado en lugar de un residuo de isoleucina (I) en la posición del epítipo correspondiente a la posición 682 del VIH. Val solo difiere de Ile por un solo grupo metilo, y Val en esta posición es capaz de los mismos contactos a 10E8 que CG1 de Ile - Val haciendo interacciones de van der Waals con el residuo de cadena pesada de 10E8 Phe100A. Sin embargo, Val podría cambiarse por Ile).

10E8_T93v2RT12-1

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNW**FDIT**NVLWDV**VKKL**TEKAINDIDDALKKMKDWL
ESG

10E8_T93v2RT12-2

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNW**FSIT**KVLWDV**VKKL**TEKAINDIDDALKKMKDWL
ESG

10E8_T93v2RT12-3

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVSW**FNIS**NVLWDV**RKL**TEKAINDIDDALKKMKDWL
ESG

10E8_T93v2RT12-4

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNW**DISR**VLWDV**VKKL**TEKAINDIDDALKKMKDWL
ESG

10E8_T93v2RT12-5

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNW**FDIT**QVLWDV**VKKL**TEKAINDIDDALKKMKDWL
ESG

10E8_T117v2-1

NAMQGIHFRRHYVRHLPKEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQ
NFPTGLPVEPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALG
NW**FDIT**NVLWW**IKAVI**QDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISELEHHHHHH

10E8_T117v2-2

NAMQGIHFRRHYVRHLPKEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQ
NFPTGLPVEPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALG
NW**FSIT**KVLWW**IKAVI**QDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISE

10E8_T117v2-3

NAMQGIHFRRHYVRHLPKEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQ
NFPTGLPVEPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALG
SW**FNIS**NVLWW**IRAVI**QDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISE

10E8_T117v2-4

NAMQGIHFRRHYVRHLPKEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQ
NFPTGLPVEPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALG
NW**FDISR**VLWW**IKAVI**QDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISE

10E8_T117v2-5

NAMQGIHFRRHYVRHLPKEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFAHDVITREQ

NFPTGLPVEPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALG

NWFEDITQVLWWIKAVIQDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISE

Las variantes de andamiaje anteriores están destinadas a usarse como una secuencia o cóctel de 3 miembros que incluye las variantes -1, -2 y -3, o una secuencia o cóctel de 5 miembros que incluye las variantes -1, -2, -3, -4 y -5.

5 Los solicitantes se referirán a estos como "cóctel de andamiaje de 3 mer" o "cóctel de andamiaje de 5 mer". Un ejemplo de una forma de emplear estas variantes sería cebar con un cóctel de andamiaje de 3 mer compuesto por 10E8_T117v2, 10E8_T117v2-2 y 10E8_T117v2-3, y luego reforzar con un cóctel de andamiaje de 3 mer compuesto por 10E8_T93v2RT12-1, 10E8_T93v2RT12-2 y 10E8_T93v2RT12-3.

10 Los cócteles de andamiaje de 3 y 5 mer se diseñaron para incluir variantes de epítomos específicos para que los cócteles: (1) se aproximen a la distribución natural de frecuencia de aminoácidos del VIH de los aminoácidos más comunes en cada posición del epítomo para la cual la suma de las frecuencias es superior al 90%, (2) maximiza la cobertura teórica de la variación de secuencia en cada posición y (3) incluye las variantes de epítomos naturales más frecuentes posibles. En el presente documento los solicitantes ilustran que se cumplieron estos objetivos de diseño.

15 Primero, se eligieron las diferentes variantes de epítomo incluidas en los cócteles de andamiaje de 3 mer y 5 mer para que los cócteles se aproximen a la distribución natural de frecuencia de aminoácidos del VIH de los aminoácidos más comunes en cada posición del epítomo. Las distribuciones naturales de frecuencia del VIH se muestran en la Tabla 4. Las distribuciones de frecuencia dentro de los cócteles de 3 mer y 5 mer se presentan en la Tabla 5. La imitación de las distribuciones de frecuencia por los cócteles es bastante buena, por ejemplo en la posición 671 del cóctel de 3 mer incluye asparagina (N) y serina (S) con frecuencias de 0,67 y 0,33, respectivamente, mientras que la distribución natural calculada en todos los clados tiene N y S con 0,72 y 0,21, respectivamente. De hecho, calcular la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) entre las distribuciones naturales de frecuencia del VIH y las distribuciones en los cócteles muestra que la frecuencia de las RMSD son 0,03 (calculadas en todos los clados), 0,02 (clado C), 0,03 (clado B) y 0,03 (todos los clados distintos de B o C). (Los solicitantes señalan que este cálculo de RMSD solo incluye contribuciones de aminoácidos que están incluidos en el cóctel; no incluye las contribuciones menores de aminoácidos que están ausentes del cóctel (frecuencia en el cóctel = 0) pero que están presentes a baja frecuencia en secuencias naturales del VIH. Como tal, este RMSD es una ligera subestimación).

30 En segundo lugar, las variantes del epítomo incluidas en los cócteles de andamiaje de 3 y 5 mer también se eligieron específicamente para maximizar la cobertura teórica de la variación de secuencia en cada posición. La Tabla 6 muestra la cobertura teórica en cada posición, y se puede ver que la cobertura es bastante alta, desde el 84% medida en todos los clados en la posición 677, hasta el 100% en todos los clados en varias posiciones. De hecho, la cobertura más baja en todos los clados es del 84% para el cóctel de 3 mer y del 93% para el cóctel de 5 mer. La cobertura total, calculada como el producto de las coberturas en cada posición y que también se muestra en la Tabla 6, es del 70% sobre todos los clados para el cóctel de 3 mer, y del 77% sobre el clado C para el cóctel de 3 mer. La cobertura total para el cóctel de 5 mer es del 73% sobre todos los clados y del 80% sobre el clado C.

40 Con base en los dos criterios anteriores (distribución de frecuencia y cobertura), los solicitantes identificaron 71 cócteles de 3 mer de variantes de epítomos que eran óptimos y equivalentes basados en tener un RMSD de frecuencia mínima de 0,03 y una cobertura máxima de 66% en todos los clados. Estos 71 cócteles de 3 mer se muestran en la Tabla 8. Cualquiera de estos cócteles de 3 mer podría ser suficiente para inducir anticuerpos ampliamente reactivos cruzados, por lo que los solicitantes contemplan el uso de cualquiera de estos cócteles desplegados en los andamiajes 10E8. Sin embargo, los solicitantes seleccionaron además un cóctel individual de esos 71, de acuerdo con el tercer criterio de los solicitantes de que un cóctel debería emplear las variantes naturales más frecuentes posibles. A partir de ese tercer criterio, los solicitantes seleccionaron el primer cóctel enumerado en la Tabla 8 como el candidato más prometedor, porque ese cóctel incluía la variante más frecuente y tenía la mayor suma de frecuencias de variantes de epítomos individuales. Con base en ese cóctel, los solicitantes diseñaron el cóctel de 5 mer para mejorar aún más la imitación general de las frecuencias de aminoácidos y la cobertura total de la variación de secuencia.

50 Los solicitantes señalan que puede resultar importante inmunizar con múltiples cócteles de 3 mer o 5 mer para obtener una respuesta óptima. Por lo tanto, los solicitantes contemplan el uso de cualquiera de los 71 cócteles de 3 mer que se muestran en los andamiajes 10E8, así como cócteles de 5 mer diseñados adecuadamente con base en esos de 3 mer. Además, los cócteles de 3 mer y 5 mer que se describen para T93v2RT12 y T117v2 también se pueden implementar en el T117v2 enmascarado con glicano.

60 Cuando se emplean diferentes andamiajes en regímenes de inmunización secuencial, puede ser importante agregar un péptido auxiliar T CD4 exógeno a cada andamiaje, para asegurar que tanto el cebado como el refuerzo contengan al menos un epítomo auxiliar T conservado. Como ejemplo de esto, los solicitantes han agregado el péptido P2 de la toxina tetánica a cada uno de los andamiajes anteriores. Se ha informado que el péptido P2 es un péptido auxiliar T "universal" que puede presentarse en diversos alelos humanos del MHC. A continuación, una etiqueta his y un

enlazador "HHHHHHGG" antes de la etiqueta P2 (QYIKANSKFIGITEL) y la presente invención contemplan tanto la presencia como la ausencia de la etiqueta his y el enlazador, así como otros epítomos auxiliares T universales para fusionar al terminal C además de una etiqueta P2. Con el péptido auxiliar P2 agregado, las secuencias de los andamiajes fueron:

5

10E8_T93v2RT12-1_P2

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNWFDITNVLWDVKKLTEKAINDIDDALKKMKDWL
ESGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGITEL

10E8_T93v2RT12-2_P2

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNWFSITKVLWDVKKLTEKAINDIDDALKKMKDWL
ESGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGITEL

10E8_T93v2RT12-3_P2

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVSWFNISNVLWDVVRKLTEKAINDIDDALKKMKDWL
ESGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGITEL

10

10E8_T93v2RT12-4_P2

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNWFDISRVLWDVKKLTEKAINDIDDALKKMKDWL
ESGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGITEL

10E8_T93v2RT12-5_P2

GKADEVREKARRRMEQAVEEFKRRLRQFEEKVKQKEPRDDEINRWIDIVKKKKADEAKK
RVEEVGDQAADEAAQLGNDPNVNWFDITQVLWDVKKLTEKAINDIDDALKKMKDWL
ESGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGITEL

15

10E8_T117v2-1_P2

NAMQGIHFRRHVVRHLPKEVSQNDIICALASPLINDGMVVSDFADHVITREQ
NFPTGLPVEPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALG
NWFDITNVLWWIKAVIQDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISEGGHHHHHHGGQYIKA
NSKFIGITEL

10E8_T117v2-2_P2

NAMQGIHFRRHVVRHLPKEVSQNDIICALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNFPTGLPV
EPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGNWFSITK
VLWWIKAVIQDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISEGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGIT
EL

20

10E8_T117v2-3_P2

NAMQGIHFRRHVVRHLPKEVSQNDIICALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNFPTGLPV
EPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGSWFNISN
VLWWIRAVIQDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISEGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGIT
EL

10E8_T117v2-4_P2

NAMQGIHFRRHVVRHLPKEVSQNDIIRALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNFTGLPV
EPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGNWFDISR
VLWWIKAVIQDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISEGGHHHHHHGGQYIKANSKFIGIT
EL

10E8_T117v2-5_P2

NAMQGIHFRRHVVRHLPKEVSQNDIIRALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNFTGLPV
EPVGVAIPHTDSKYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGNWFDITQ
VLWWIKAVIQDEDFMQQLVMNDDEIYQSIYTRISEGGHHHHHHHHGGQYIKANSKFIGIT
EL

5 Los solicitantes observan que estas variantes de P2 también incluyeron una etiqueta his (HHHHHH) para la purificación, pero eso no es obligatorio.

10 Un andamiaje adicional (10E8_T117v2-1_RSFI), antigénicamente distinto de los andamiajes T93v2, T93v2RT12 y T117v2, se diseñó mediante el recubrimiento superficial de T117v2. Este andamiaje también tiene una alta afinidad por el anticuerpo 10E8. Este nuevo andamiaje es útil para evaluar las respuestas específicas del epítipo inducidas por los otros andamiajes, y este nuevo andamiaje también puede ser útil como un inmunógeno solo o usado en regímenes de inmunización heterólogos secuenciales con otros andamiajes. El nuevo andamiaje se puede expresar con el mismo cóctel de epítipos como se discutió anteriormente.

15 10E8_T117v2-1_RSFI

NAMAGIVFRKHVVRHLGKTVTQNEIIRALAAPLISDGMVVKDFADHVIKREEQNPTGLP
VQPVGVAIPHTDSKYVYYNAISVGILQEPVAFEDAGGDGRPVPVRVVFMLALGNWFDI
TNVLWWIKAVIQDDEFMKRLLYMTDDKIYESIRKRIYDLE

10E8_T117v2-2_RSFI

NAMAGIVFRKHVVRHLGKTVTQNEIIRALAAPLISDGMVVKDFADHVIKREEQNPTGLP
VQPVGVAIPHTDSKYVYYNAISVGILQEPVAFEDAGGDGRPVPVRVVFMLALGNWFSIT
KVLWWIKAVIQDDEFMKRLLYMTDDKIYESIRKRIYD

10E8_T117v2-3_RSFI

20 NAMAGIVFRKHVVRHLGKTVTQNEIIRALAAPLISDGMVVKDFADHVIKREEQNPTGLP
VQPVGVAIPHTDSKYVYYNAISVGILQEPVAFEDAGGDGRPVPVRVVFMLALGSWFNIS
NVLWWIRAVIQDDEFMKRLLYMTDDKIYESIRKRIYD

10E8_T117v2-4_RSFI

NAMAGIVFRKHVVRHLGKTVTQNEIIRALAAPLISDGMVVKDFADHVIKREEQNPTGLP
VQPVGVAIPHTDSKYVYYNAISVGILQEPVAFEDAGGDGRPVPVRVVFMLALGNWFDI
SRVLWWIKAVIQDDEFMKRLLYMTDDKIYESIRKRIYD

10E8_T117v2-5_RSFI

25 NAMAGIVFRKHVVRHLGKTVTQNEIIRALAAPLISDGMVVKDFADHVIKREEQNPTGLP
VQPVGVAIPHTDSKYVYYNAISVGILQEPVAFEDAGGDGRPVPVRVVFMLALGNWFDI
TQVLWWIKAVIQDDEFMKRLLYMTDDKIYESIRKRIYD

El almacén T117v2 también se modificó mediante enmascaramiento de glicano, en el que se añadieron sitios de glicosilación unidos a N en posiciones expuestas en la superficie fuera del epítipo 10E8. Esto puede ser útil para

enfocar las respuestas inmunes en el epítipo, al reducir las respuestas a las áreas glicosiladas. Los glicanos también pueden enfocar el ángulo de aproximación de los anticuerpos contra el epítipo. Se diseñaron y probaron varios constructos. Las dos constructos con el mayor grado de glicosilación que retuvieron una alta afinidad por los anticuerpos 10E8 y 4E10 fueron 10E8_T117v2-1_g28_g91012 y 10E8_T117v2-1_g258_g91012. Los sitios de glicosilación adicionales se indican en negrita.

10E8_T117v2-1_g28_g91012

NAMQGIHFRRHYVRHLPKNVSNQNDIHKALASPLINDGMVVSDFAHDHVITRENNSTGLP
VEPVGVAIPHTDSKYVNQSAISVGILAEPVNFEDANGTPDPVPVRVVFMLALGNWFDIT
NVLWWIKAVIQDEDFMQQLNMSDDEIYQSIYTRISE

10E8_T117v2-1_g258_g91012

NAMQGIHFRRHYVRHLPKNVSNQNDIHKALASPLINDGMVVSDFAHDHVITRENNSTGLP
VEPVGVAIPHTDSKYVNQSAISVGILAEPVNFEDANGTPDPVPVRVVFMLALGNWFDIT
NVLWWIKAVIQNASFMQQLNMSDDEIYQSIYTRISE

Estos andamiajes son nuevos inmunógenos para inducir respuestas específicas del epítipo contra el epítipo 10E8 conformacional, especialmente cuando se emplean en regímenes de inmunización heterólogos de refuerzo primario. Se inmunizaron seis grupos de macacos rhesus (3 macacos por grupo) por vía intramuscular con adyuvante Iscomatrix, ya sea a los 0, 1, 3 meses (grupos 1, 2, 3, 4) o con un cebador a los 0, 1 mes seguido de un refuerzo heterólogo a los 3 meses (grupos 5 y 6). Los grupos incluyeron los siguientes inmunógenos: T93v2RT12-1 (grupo 1), T117v2-1 (grupo 2), T93v2RT12-1, T93v2RT12-2 y T93v2RT12-3 (grupo 3), T117v2-1_P2, T117v2-2_P2 y T117v2-3_P2 (grupo 4), T93v2RT12-1_P2, T93v2RT12-2_P2 y T93v2RT12-3_P2 a los 0, 1 mes y T117v2-1_P2, T117v2-2_P2, y T117v2-3_P2 a los 3 meses (grupo 5), T117v2-1_P2, T117v2-2_P2, y T117v2-3_P2 a los 0, 1 meses y T93v2RT12-1_P2, T93v2RT12-2_P2 y T93v2RT12-3_P2 a los 3 meses (grupo 6). Para analizar las respuestas específicas del epítipo, los solicitantes probaron el plasma animal para la unión al T117v2 de recubrimiento superficial (10E8_T117v2-1_RSf1), así como un mutante de inactivación del epítipo que tiene una afinidad reducida 1000 veces por 10E8 (10E8_T117v2-1_RSf1_KO3, K_D para 10E8 es 50 nM en comparación con 50 pM para 10E8_T117v2-1_RSf1). El plasma de todos los animales tomado en el día 0 no mostró reactividad con 10E8_T117v2-1_RSf1 o 10E8_T117v2-1_RSf1_KO3 (no mostrado). Para los grupos 1-4 que recibieron regímenes de inmunización homólogos que repiten el mismo antígeno o antígenos, el plasma tomado 2 semanas después de la tercera inmunización mostró una reactividad similar tanto para 10E8_T117v2-1_RSf1 y 10E8_T117v2-1_RSf1_KO3. Por lo tanto, no hubo evidencia de respuestas específicas de epítopos en esos grupos. Sin embargo, para los grupos 5 y 6 que recibieron inmunizaciones heterólogas de refuerzo primario, el plasma tomado 2 semanas después de la tercera inmunización mostró una reactividad específica de epítipo apreciable indicada por una mayor unión de ELISA a 10E8_T117v2-1_RSf1 en comparación con 10E8_T117v2-1_RSf1_KO3. El grupo 6 tuvo las mayores respuestas específicas de epítipo.

La solicitud abarca además secuencias de nucleótidos que codifican variantes y derivados funcional y/o antigénicamente equivalentes de los antígenos de la invención y fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos. Estas variantes, derivados y fragmentos funcionalmente equivalentes muestran la capacidad de retener la actividad antigénica. Por ejemplo, los cambios en una secuencia de ADN que no cambian la secuencia codificada de aminoácidos, así como aquellas que dan como resultado sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o algunas eliminaciones o adiciones de aminoácidos, y la sustitución de residuos de aminoácidos por análogos de aminoácidos son aquellos que no afectarán significativamente las propiedades del polipéptido codificado. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son glicina/alanina; valina/isleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina/metionina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina/triptófano. En una realización, las variantes tienen al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología o identidad con el antígeno, epítipo, inmunógeno, péptido o polipéptido de interés. Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia u homología se determina comparando las secuencias cuando se alinean para maximizar la superposición y la identidad mientras se minimizan los huecos de la secuencia. En particular, la identidad de secuencia puede determinarse usando cualquiera de varios algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 5873-5877.

Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers & Miller, CABIOS 1988; 4: 11-17. Dicho algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar

secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Otro algoritmo útil para identificar regiones de similitud y alineación de secuencia local es el algoritmo FASTA como se describe en Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2444-2448.

Ventajoso para su uso de acuerdo con la presente invención es el software WU-BLAST (Washington University BLAST) versión 2.0. Los programas ejecutables de WU-BLAST versión 2.0 para varias plataformas UNIX se pueden descargar desde <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>. Este programa se basa en WU-BLAST versión 1.4, que a su vez se basa en NCBI-BLAST de dominio público versión 1.4 (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul et al., Journal of Molecular Biology 1990; 215: 403-410; Gish & States, 1993; Nature Genetics 3:266-272; Karlin & Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877).

Las diversas secuencias de nucleótidos recombinantes y los anticuerpos divulgados allí se elaboran usando técnicas estándar de ADN recombinante y clonación. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989).

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden insertarse en "vectores". El término "vector" es ampliamente utilizado y entendido por los expertos en la materia, y como se usa en el presente documento, el término "vector" se usa de manera coherente con su significado para los expertos en la materia. Por ejemplo, el término "vector" es comúnmente usado por los expertos en la técnica para referirse a un vehículo que permite o facilita la transferencia de moléculas de ácido nucleico de un entorno a otro o que permite o facilita la manipulación de una molécula de ácido nucleico.

Se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos divulgados. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden usarse *in vitro* (tal como el uso de sistemas de expresión libres de células) y/o en células cultivadas crecidas *in vitro* para producir los anticuerpos codificados contra el VIH que luego pueden usarse para diversas aplicaciones tales como en la producción de vacunas proteicas. Para tales aplicaciones, se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos *in vitro* y/o en células cultivadas.

Para aplicaciones en la que se desea que los anticuerpos se expresen *in vivo*, por ejemplo, cuando los transgenes de la invención se usan en ADN o vacunas que contienen ADN, cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos y sea seguro para su uso *in vivo* puede ser utilizado. En realizaciones preferidas, los vectores utilizados son seguros para su uso en humanos, mamíferos y/o animales de laboratorio.

Para que los anticuerpos se expresen, la secuencia de codificación de proteínas debe estar "operativamente unida" a secuencias reguladoras o de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción y traducción de la proteína. Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia de codificación y una secuencia o promotor de control de ácido nucleico están "operativamente unidas" cuando están unidas covalentemente de manera que coloque la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia de codificación bajo la influencia o control de la secuencia de control de ácido nucleico. La "secuencia de control de ácido nucleico" puede ser cualquier elemento de ácido nucleico, tal como, sin limitación, promotores, potenciadores, IRES, intrones y otros elementos descritos en el presente documento que dirigen la expresión de una secuencia de ácido nucleico o secuencia codificante que está operativamente unida a los mismos. El término "promotor" se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que se agrupan alrededor del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II y que, cuando están operativamente unidos a las secuencias de codificación de proteínas de la invención, conducen a la expresión de la proteína codificada. La expresión de los transgenes puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible, que inicia la transcripción solo cuando se expone a algún estímulo externo particular, tal como, sin limitación, antibióticos como la tetraciclina, hormonas como la ecdisona, o metales pesados. El promotor también puede ser específico para un tipo de célula, tejido u órgano particular. Se conocen muchos promotores y potenciadores adecuados en la técnica, y cualquiera de dichos promotores o potenciadores adecuados puede usarse para la expresión de los transgenes. Por ejemplo, se pueden seleccionar promotores y/o potenciadores adecuados de la base de datos de promotores eucariotas (EPDB).

Los vectores usados de acuerdo con la presente solicitud deberían elegirse típicamente de modo que contengan una región adecuada reguladora de genes, tal como un promotor o potenciador, de modo que los anticuerpos puedan expresarse.

Por ejemplo, cuando el objetivo es expresar los anticuerpos *in vitro*, o en células cultivadas, o en cualquier sistema procarionta o eucariota con el propósito de producir la proteína o proteínas codificadas por ese anticuerpo, entonces cualquier vector adecuado puede ser usado dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, pueden usarse plásmidos, vectores virales, vectores bacterianos, vectores de protozoos, vectores de insectos, vectores de expresión de baculovirus, vectores de levadura, vectores de células de mamífero y similares. El experto en la materia puede seleccionar los vectores adecuados teniendo en cuenta las características del vector y los requisitos para expresar los anticuerpos en las circunstancias identificadas.

En una realización ventajosa, los vectores de expresión de IgG1 pueden utilizarse para reconstituir regiones constantes de cadena pesada y ligera si se clonan genes de cadena pesada y ligera de los anticuerpos.

Quando el objetivo es expresar los anticuerpos *in vivo* en un sujeto, por ejemplo, para generar una respuesta inmune contra un antígeno de VIH-1 y/o inmunidad protectora contra el VIH-1, vectores de expresión que son adecuados para la expresión en ese sujeto, y que son seguros para su uso *in vivo*, deben elegirse. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede desearse expresar los anticuerpos en un animal de laboratorio, tal como para pruebas preclínicas de las composiciones inmunogénicas y vacunas contra VIH-1. Puede ser deseable expresar los anticuerpos en sujetos humanos, tal como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunogénicas y vacunas. Se puede emplear cualquier vector que sea adecuado para tales usos, y está dentro de las capacidades del experto en la técnica seleccionar un vector adecuado. En algunas realizaciones, puede preferirse que los vectores usados para estas aplicaciones *in vivo* se atenúen al vector desde la amplificación en el sujeto. Por ejemplo, si se usan vectores plasmídicos, preferiblemente carecerán de un origen de replicación que funcione en el sujeto para mejorar la seguridad para el uso *in vivo* en el sujeto. Si se usan vectores virales, preferiblemente están atenuados o tienen una replicación defectuosa en el sujeto, nuevamente, para mejorar la seguridad para el uso *in vivo* en el sujeto.

Los vectores de expresión viral son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, virus tales como adenovirus, virus adenoasociados (AAV), alfavirus, virus del herpes, retrovirus y virus de la viruela, que incluyen virus de la viruela aviar, virus de la viruela atenuados, virus vacuna, y particularmente, el virus vaccinia Ankara modificado (MVA; ATCC acceso número VR-1566). Dichos virus, cuando se usan como vectores de expresión, son en forma innata no patógenos en los sujetos seleccionados, tales como humanos, o se han modificado para que no sean patógenos en los sujetos seleccionados. Por ejemplo, los adenovirus y alfavirus defectuosos en la replicación son bien conocidos y pueden usarse como vectores de administración génica.

Las secuencias de nucleótidos y los vectores de la invención pueden administrarse a las células, por ejemplo, si el objetivo es expresar los antígenos del VIH-1 en las células para producir y aislar las proteínas expresadas, tal como las células que crecieron en cultivo. Para expresar los anticuerpos en las células, se puede usar cualquier método de transfección, transformación o administración de genes adecuado. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia, y un experto en la materia podría seleccionar fácilmente un método adecuado dependiendo de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos, los vectores y los tipos de células utilizados. Por ejemplo, se podría usar transfección, transformación, microinyección, infección, electroporación, lipofección o administración mediada por liposomas. La expresión de los anticuerpos se puede llevar a cabo en cualquier tipo adecuado de células huésped, tales como células bacterianas, levaduras, células de insectos y células de mamíferos. Los anticuerpos también se pueden expresar usando sistemas de transcripción/traducción *in vitro*. Todos esos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia, y un experto en la materia podría seleccionar fácilmente un método adecuado dependiendo de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos, los vectores y los tipos de células utilizados.

Las secuencias de nucleótidos o anticuerpos pueden administrarse *in vivo*, por ejemplo, cuando el objetivo es producir una respuesta inmunogénica en un sujeto. Un "sujeto" puede ser cualquier animal. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede desearse expresar los transgenes en un animal de laboratorio, tal como para pruebas preclínicas de las composiciones inmunogénicas y vacunas de VIH-1 de la invención. En otras realizaciones, será deseable expresar los anticuerpos en sujetos humanos, tal como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunogénicas y la vacuna de la invención. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que está infectado con, o está en riesgo de infección con, VIH-1.

El término "composición farmacéutica" se usa en el presente documento para definir una composición sólida o líquida en una forma, concentración y nivel de pureza adecuados para la administración a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) tras lo cual puede provocar los cambios fisiológicos deseados. Los términos "composición inmunogénica" y "composición inmunológica" y "composición inmunogénica o inmunológica" cubren cualquier composición que provoque una respuesta inmune contra el patógeno objetivo, VIH. Los términos tales como "composición vacunal" y "vacuna" y "composición de vacuna" cubren cualquier composición que induzca una respuesta inmune protectora contra el patógeno objetivo o que proteja eficazmente contra el patógeno; por ejemplo, después de la administración o inyección, provoca una respuesta inmune protectora contra el patógeno objetivo o proporciona protección eficaz contra el patógeno. Por consiguiente, una composición inmunogénica o inmunológica induce una respuesta inmune que puede, pero no necesariamente, ser una respuesta inmune protectora. Se puede usar una composición inmunogénica o inmunológica en el tratamiento de individuos infectados con el patógeno, por ejemplo, para estimular una respuesta inmune contra el patógeno, tal como estimulando anticuerpos contra el patógeno. Por lo tanto, una composición inmunogénica o inmunológica puede ser una composición farmacéutica. Además, cuando el texto habla de "inmunógeno, antígeno o epítipo", un inmunógeno puede ser un antígeno o un epítipo de un antígeno. Una composición de diagnóstico es una composición que contiene un compuesto o anticuerpo, por ejemplo, un compuesto o anticuerpo marcado, que se utiliza para detectar la presencia en una muestra, tal como una muestra biológica, por ejemplo, sangre, semen, fluido vaginal, etc., de un anticuerpo que se une al compuesto o un inmunógeno, antígeno o epítipo que se une al anticuerpo; por ejemplo, un anticuerpo anti-VIH o un inmunógeno, antígeno o epítipo del VIH.

Para tales aplicaciones *in vivo*, las secuencias de nucleótidos o anticuerpos se administran preferiblemente como un componente de una composición inmunogénica que puede comprender las secuencias de nucleótidos y/o antígenos de la invención en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones inmunogénicas de la

invención son útiles para estimular una respuesta inmune contra el VIH-1 y se pueden usar como uno o más componentes de una vacuna profiláctica o terapéutica contra el VIH-1 para la prevención, mejora o tratamiento del SIDA. Los ácidos nucleicos y los vectores de la invención son particularmente útiles para proporcionar vacunas genéticas, es decir, vacunas para administrar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención a un sujeto, tal como un ser humano, de modo que los anticuerpos se expresen en el sujeto para provocar una respuesta inmune.

Las composiciones de la invención pueden ser suspensiones inyectables, soluciones, aerosoles, polvos liofilizados, jarabes, elixires y similares. Se puede usar cualquier forma adecuada de composición. Para preparar dicha composición, un ácido nucleico o vector de la invención, que tiene el grado deseado de pureza, se mezcla con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los portadores y excipientes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, entre otros, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol o combinaciones de los mismos, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN^{MR}, PLURONICS^{MR} o polietilenglicol (PEG).

Una composición inmunogénica o inmunológica también puede formularse en forma de una emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua puede basarse, por ejemplo, en aceite de parafina líquida ligera (tipo Farmacopea europea); aceite isoprenoide tal como escualano, escualeno, EICOSANO^{MR} o tetratetracontano; aceite resultante de la oligomerización de alqueno o alquenos, por ejemplo, isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, di(capilato/caprato) de propilenglicol, tri(capilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, por ejemplo, ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa ventajosamente en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de sorbitán, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol, propilenglicol y ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que son opcionalmente etoxilados y bloques de copolímero polioxipropileno-polioxietileno, tales como los productos de Pluronic®, por ejemplo, L121. El adyuvante puede ser una mezcla de emulsionantes, agente formador de micelas y aceite tal como aquel que está disponible comercialmente bajo el nombre de Provac® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA).

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sustancias adicionales, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes o adyuvantes para mejorar la efectividad de las vacunas (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, (ed.) 1980).

También se pueden incluir adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, entre otros, sales minerales (por ejemplo, AlK (SO₄)₂, AlNa(SO₄), AlNH(SO₄)₂, sílice, alumbre, Al(OH)₃, Ca₃(PO₄)₂, caolín, o carbono), polinucleótidos con o sin complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (por ejemplo, oligonucleótidos CpG, tales como los descritos en Chuang, TH et al., (2002) J. Leuk. Biol. 71 (3): 538-44; Ahmad-Nejad, P. et al., (2002) Eur. J. Immunol. 32 (7): 1958-68; ácidos poli IC o poli AU, poliarginina con o sin CpG (también conocido en la técnica como IC31; véase Schellack, C. et al., (2003) Actas de la trigésimo cuarta Reunión Anual de la Sociedad Alemana de Inmunología; Lingnau, K. et al., (2002) Vaccine 20 (29-30): 3498-508), JuvaVax^{MR} (patente de los Estados Unidos No. 6.693.086), ciertas sustancias naturales (por ejemplo, cera D de Mycobacterium tuberculosis, sustancias encontradas en Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis o miembros del género Brucella), flagelina (ligando del receptor 5 tipo Toll; véase McSorley, SJ et al., (2002) J. Immunol 169 (7): 3914-9), saponinas tales como QS21, QS17, y QS7 (patentes de los Estados Unidos Nos. 5.057.540; 5.650.398; 6.524.584; 6.645.495), lípido A monofosforilado, en particular, lípido A monofosforilado 3-de-O-acilado (3D-MPL), imiquimod (también conocido en la técnica como IQM y disponible comercialmente como Aldara®; patentes de los Estados Unidos Nos. 4.689.338; 5.238.944; Zuber, AK et al., (2004) 22 (13-14): 1791-8), y el inhibidor de CCR5 CMPD167 (véase Veazey, RS et al., (2003) J. Exp. Med. 198: 1551-1562).

El hidróxido o fosfato de aluminio (alumbre) se usan comúnmente en una solución del 0,05 al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato. Otros adyuvantes que se pueden usar, especialmente con las vacunas de ADN, son la toxina del cólera, especialmente los CTA1-DD/ISCOM (véase Mowat, AM et al., (2001) J. Immunol. 167 (6): 3398-405), polifosfacenos (Allcock, HR (1998) App. Organometallic Chem. 12 (10-11): 659-666; Payne, LG et al., (1995) Pharm. Biotechnol. 6: 473-93), citocinas tales como, entre otras, IL-2, IL-4, GM-CSF, IL-12, IL-15, IGF-1, IFN-α, IFN-β e IFN-γ (Boyer et al., (2002) J. Liposome Res. 121: 137-142; WO01/095919), proteínas inmunorreguladoras tales como CD40L (ADX40; véase, por ejemplo, el documento WO03/063899), y el ligando CD1a de células asesinas naturales (también conocido como CRONY o α-galactosil ceramida; véase Green, TD et al., (2003) J. Virol. 77 (3): 2046-2055),

proteínas de fusión inmunoestimulantes tales como IL-2 fusionadas al fragmento Fc de inmunoglobulinas (Barouch et al., Science 290: 486-492, 2000) y moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 (Boyer), todas las cuales pueden administrarse como proteínas o en forma de ADN, en los mismos vectores de expresión que aquellos que codifican los antígenos de la invención o en vectores de expresión separados.

En una realización ventajosa, los adyuvantes pueden ser lecitina combinada con un polímero acrílico (Adjuplex-LAP), gotas de aceite recubiertas de lecitina en una emulsión de aceite en agua (Adjuplex-LE) o lecitina y polímero acrílico en una emulsión de aceite en agua (Adjuplex-LAO) (Advanced BioAdjuvants (ABA)).

Las composiciones inmunogénicas pueden diseñarse para introducir los ácidos nucleicos o los vectores de expresión en un sitio de acción deseado y liberarlo a una velocidad apropiada y controlable. Los métodos para preparar formulaciones de liberación controlada son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para formar complejos o absorber el inmunógeno y/o la composición inmunogénica. Se puede preparar una formulación de liberación controlada utilizando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de etileno y vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) que se sabe que proporcionan las características deseadas de liberación controlada o el perfil de liberación. Otro posible método para controlar la duración de la acción mediante una preparación de liberación controlada es incorporar los ingredientes activos en partículas de un material polimérico tal como, por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de estos ácidos, o copolímeros de acetato de vinilo y etileno. Alternativamente, en lugar de incorporar estos ingredientes activos en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en New Trends and Developments in Vaccines, Voller et al., (eds.), University Park Press, Baltimore, Maryland, 1978 y Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición.

Las dosis adecuadas de los ácidos nucleicos y los vectores de expresión en la composición inmunogénica de la invención pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia. Por ejemplo, la dosificación de los anticuerpos puede variar dependiendo de la ruta de administración y el tamaño del sujeto. Los expertos en la materia pueden determinar las dosis adecuadas, por ejemplo midiendo la respuesta inmune de un sujeto, tal como un animal de laboratorio, utilizando técnicas inmunológicas convencionales, y ajustando las dosis según sea apropiado. Dichas técnicas para medir la respuesta inmune del sujeto incluyen, pero no se limitan a, ensayos de liberación de cromó, ensayos de unión a tetrámero, ensayos ELISPOT de IFN- γ , ensayos ELISPOT de IL-2, ensayos de citocinas intracelulares y otros ensayos de detección inmunológica, por ejemplo, como el detallado en el texto "Antibodies: A Laboratory Manual" por Ed Harlow y David Lane.

Cuando se proporcionan profilácticamente, las composiciones inmunogénicas de la invención se administran idealmente a un sujeto antes de la infección por VIH, o evidencia de infección por VIH, o antes de cualquier síntoma debido al SIDA, especialmente en sujetos de alto riesgo. La administración profiláctica de las composiciones inmunogénicas puede servir para proporcionar inmunidad protectora de un sujeto contra la infección por VIH-1 o para prevenir o atenuar la progresión del SIDA en un sujeto ya infectado con VIH-1. Cuando se proporcionan terapéuticamente, las composiciones inmunogénicas pueden servir para mejorar y tratar los síntomas del SIDA y se usan ventajosamente tan pronto como sea posible después de la infección, preferiblemente antes de la aparición de cualquier síntoma del SIDA, pero también se pueden usar al (o después) inicio de los síntomas de la enfermedad.

Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar usando cualquier método de administración adecuado, que incluye, pero no se limita a, administración intramuscular, intravenosa, intradérmica, mucosa y tópica. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Ejemplos más específicos de métodos de administración son inyección intramuscular, inyección intradérmica e inyección subcutánea. Sin embargo, la administración no necesita limitarse a los métodos de inyección. Además, la administración de ADN al tejido animal se ha logrado mediante liposomas catiónicos (Watanabe et al., (1994) Mol. Reprod. Dev. 38: 268-274; y el documento WO 96/20013), inyección directa de ADN desnudo en el tejido muscular del animal (Robinson et al., (1993) Vaccine 11: 957-960; Hoffman et al., (1994) Vaccine 12: 1529-1533; Xiang et al., (1994) Virology 199: 132-140; Webster et al., (1994) Vaccine 12: 1495-1498; Davis et al., (1994) Vaccine 12: 1503-1509; y Davis et al., (1993) Hum. Mol. Gen. 2: 1847-1851), o inyección intradérmica de ADN usando tecnología de "pistola de genes" (Johnston et al., (1994) Meth. Cell Biol. 43: 353-365). Alternativamente, las rutas de administración pueden ser orales, intranasales o por cualquier otra ruta adecuada. La administración también se puede lograr a través de una superficie de la mucosa, tal como la mucosa anal, vaginal u oral.

Los esquemas (o regímenes) de inmunización son bien conocidos para los animales (incluidos los humanos) y pueden determinarse fácilmente para el sujeto particular y la composición inmunogénica. Por lo tanto, los inmunógenos se pueden administrar una o más veces al sujeto. Preferiblemente, hay un intervalo de tiempo establecido entre administraciones separadas a la composición inmunogénica. Si bien este intervalo varía para cada sujeto, generalmente varía de 10 días a varias semanas, y a menudo es de 2, 4, 6 u 8 semanas. Para los humanos, el intervalo es típicamente de 2 a 6 semanas. Los regímenes de inmunización típicamente tienen de 1 a 6 administraciones de la

composición inmunogénica, pero pueden tener tan solo uno o dos o cuatro. Los métodos para inducir una respuesta inmune también pueden incluir la administración de un adyuvante con los inmunógenos. En algunos casos, la inmunización de refuerzo anual, bianual u otro intervalo prolongado (5-10 años) puede complementar el protocolo de inmunización inicial.

Los métodos presentes también incluyen una variedad de regímenes de refuerzo principal, por ejemplo, regímenes de refuerzo principal de adenovirus de ADN. En estos métodos, una o más inmunizaciones de cebado son seguidas por una o más inmunizaciones de refuerzo. La composición inmunogénica real puede ser igual o diferente para cada inmunización y el tipo de composición inmunogénica (por ejemplo, que contiene proteína o vector de expresión), la ruta y la formulación de los inmunógenos también se pueden variar. Por ejemplo, si se usa un vector de expresión para las etapas de cebado y refuerzo, puede ser del mismo tipo o de un tipo diferente (por ejemplo, ADN o vector de expresión bacteriano o viral). Un régimen de refuerzo principal útil proporciona dos inmunizaciones de cebado, con cuatro semanas de diferencia, seguidas de dos inmunizaciones de refuerzo a las 4 y 8 semanas después de la última inmunización de cebado. También debería ser evidente para un experto en la materia que hay varias permutaciones y combinaciones que están abarcadas usando los vectores de expresión de ADN, bacterianos y virales de la invención para proporcionar regímenes de cebado y refuerzo.

Una realización específica de la presente descripción proporciona métodos para inducir una respuesta inmune contra el VIH en un sujeto mediante la administración de una composición inmunogénica de la invención, preferiblemente que puede comprender un vector de adenovirus que contiene ADN que codifica uno o más de los anticuerpos, una o más veces a un sujeto en el que los epítomos se expresan a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmune específica en el sujeto. Dichas inmunizaciones pueden repetirse múltiples veces a intervalos de tiempo de al menos 2, 4 o 6 semanas (o más) de acuerdo con un régimen de inmunización deseado.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse solas, o pueden administrarse conjuntamente, o administrarse secuencialmente, con otros inmunógenos de VIH y/o composiciones inmunogénicas de VIH, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacunas o terapéuticas proporcionando de ese modo composiciones multivalentes o de "cóctel" o combinación de composiciones de la invención y métodos para emplearlas. Nuevamente, los ingredientes y la forma (secuencial o coadministración) de la administración, así como las dosis, pueden determinarse teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y el estado del sujeto en particular, y la vía de administración.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse solas, o pueden administrarse conjuntamente, o administrarse secuencialmente, con otros agentes terapéuticos, proporcionando de ese modo composiciones multivalentes o de "cóctel" o combinaciones de la invención y métodos para emplearlas. El agente terapéutico puede ser un agente antiviral. Los agentes antivirales útiles incluyen, pero no se limitan a, análogos de nucleósidos, tales como zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir e interferones alfa. Nuevamente, los ingredientes y la forma (secuencial o coadministración) de la administración, así como las dosis, pueden determinarse teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y el estado del sujeto en particular, y la vía de administración.

Cuando se usan en combinación, los otros inmunógenos del VIH pueden administrarse al mismo tiempo o en diferentes momentos como parte de un régimen de inmunización global, por ejemplo, como parte de un régimen de refuerzo principal u otro protocolo de inmunización. En una realización ventajosa, el otro inmunógeno de VIH es env, preferiblemente el trímico env de VIH.

Se conocen muchos otros inmunógenos del VIH en la técnica, uno de dichos inmunógenos preferidos es el VIHA (descrito en el documento WO 01/47955), que puede administrarse como una proteína, en un plásmido (por ejemplo, pThr.VIHA) o en un vector viral (por ejemplo, MVA.VIHA). Otro de estos inmunógenos del VIH es RENTA (descrito en el documento PCT/US2004/037699), que también se puede administrar como una proteína, en un plásmido (por ejemplo, pThr.RENTA) o en un vector viral (por ejemplo, MVA.RENTA).

Por ejemplo, un método para inducir una respuesta inmune contra el VIH en un sujeto humano puede comprender administrar al menos una dosis de cebado de un inmunógeno de VIH y al menos una dosis de refuerzo de un inmunógeno de VIH, en el que el inmunógeno en cada dosis puede ser igual o diferente, siempre que al menos uno de los inmunógenos sea un epítomo de la presente invención, un ácido nucleico que codifica un epítomo de la invención o un vector de expresión, preferiblemente un vector VSV, que codifica un epítomo de la invención, y en el que los inmunógenos se administran en una cantidad o se expresan a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmune específica del VIH en el sujeto. La respuesta inmune específica de VIH puede incluir una respuesta inmune de células T específica de VIH o una respuesta inmune de células B específicas de VIH. Dichas inmunizaciones pueden realizarse a intervalos, preferiblemente de al menos 2-6 o más semanas.

Habiendo así descrito en detalle realizaciones preferidas de la presente invención, debe entenderse que la invención definida por los párrafos anteriores no debe limitarse a detalles particulares establecidos en la descripción anterior ya que son posibles muchas variaciones evidentes de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno 10E8 que consiste en la secuencia de aminoácidos:

10E8_T298v2

GSEVSQNDIIKALASPLINDGMVVSDFADHVITREQNAPTGLPVEPVGVAIPHTDS

KYVRQNAISVGILAEPVNFEDAGGEPDPVPVRVVFMLALGNWFDITNVLWWIKA

VIQDADFMQQLLRMNDDEIYQSIYTRISEAAGMAGIHFRRHVVRHLG.

2. Una composición que comprende el inmunógeno de la reivindicación 1 en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. La composición de la reivindicación 2 para usar en un método para obtener un anticuerpo anti-VIH humano.

4. Una molécula de ácido nucleico que codifica el inmunógeno de la reivindicación 1.

5. Un método para obtener anticuerpos anti-VIH que comprende administrar sistémicamente a un huésped mamífero no humano o aviar una cantidad eficaz del inmunógeno de la reivindicación 1 para obtener el anticuerpo.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el huésped es un mamífero no humano.

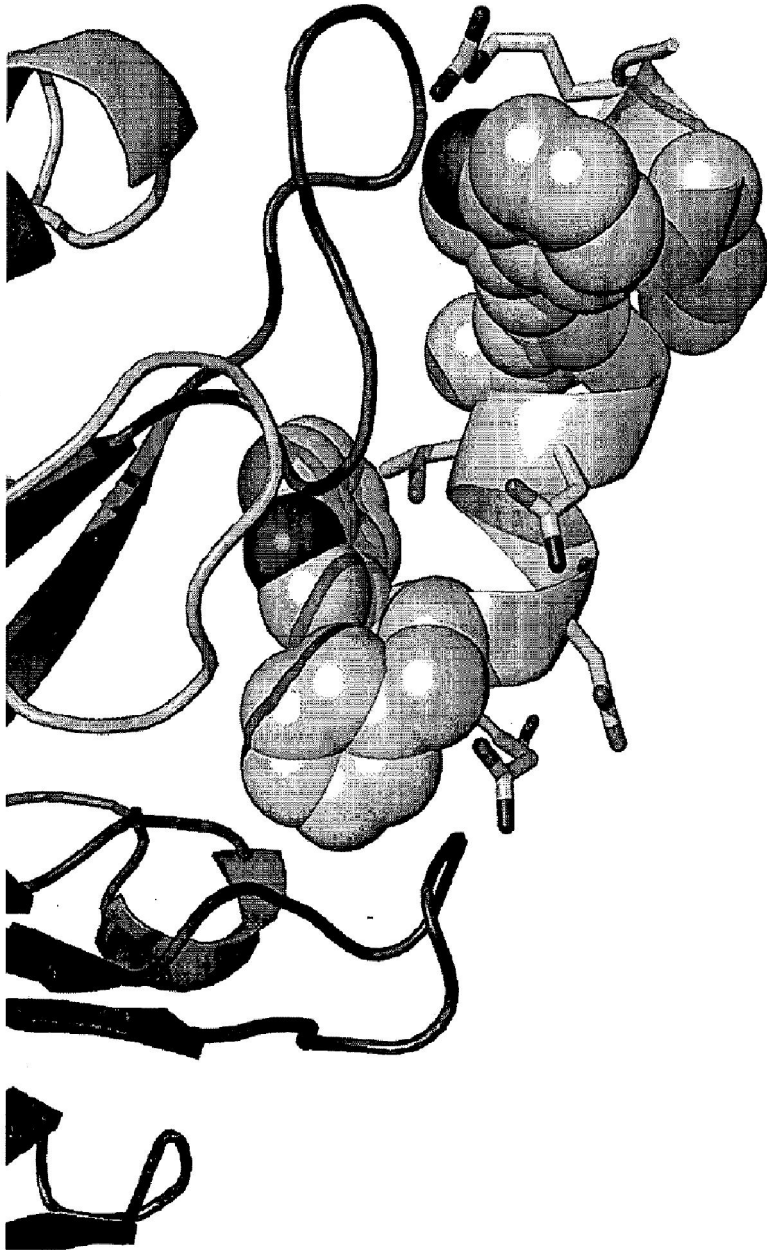


FIG. 1

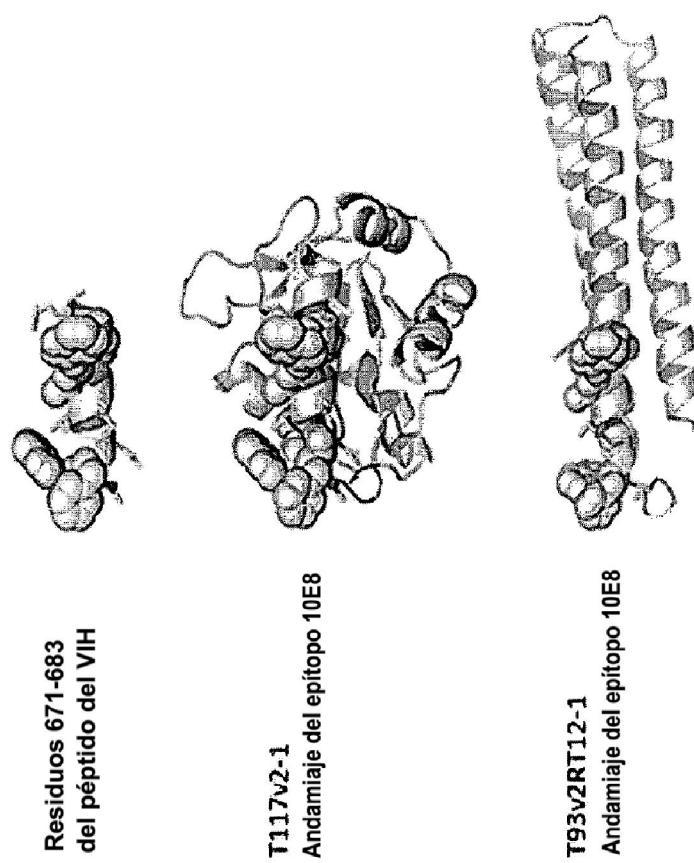


FIG. 2

FIG. 3A

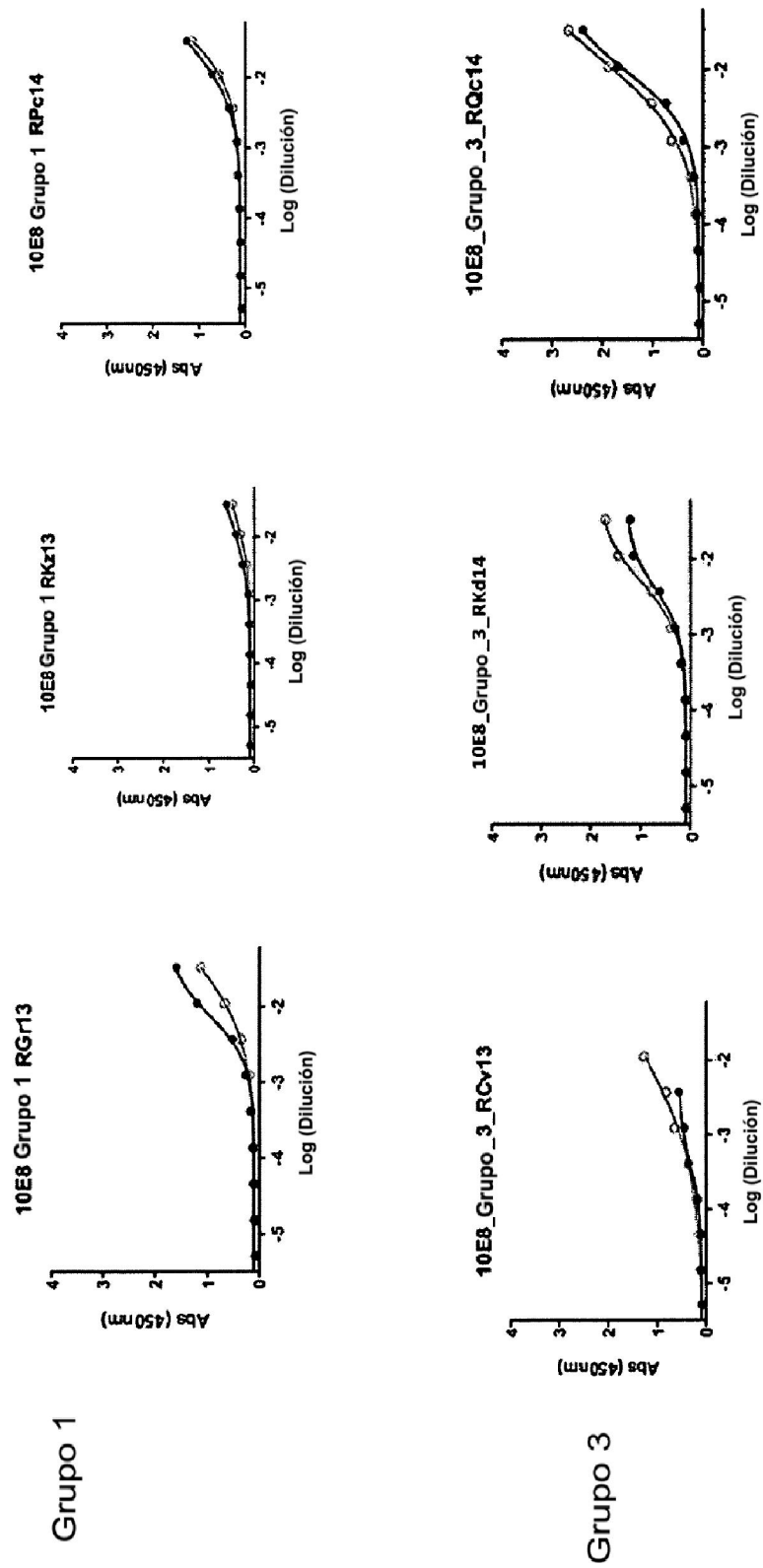


FIG. 3B

