

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
13 mars 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/020755 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/16, 16/10, C12N 15/48, A61K 48/00,
39/21, 39/395, A61P 31/18, G01N 33/53

Frédéric [FR/FR]; 6 Rue Gaspard André, F-69002
Lyon (FR). **REYNARD, Frédéric** [FR/FR]; 11 Rue
d'Aguesseau, F-69007 Lyon (FR). **VERRIER, Bernard**
[FR/FR]; Chemin du Granit, La Pavière, F-69440 Mornant
(FR). **ATAMAN-ÖNAL, Yasemin** [FR/FR]; 9 Cours
Albert Thomas, F-69003 Lyon (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/03039

(22) Date de dépôt international :

6 septembre 2002 (06.09.2002)

(74) Mandataire : **CABINET GERMAIN & MAUREAU**; 12
rue Boileau, F-69006 Lyon (FR).

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

01/11699 6 septembre 2001 (06.09.2001) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **BEDIN**,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MUTATED *ENV* GENE, MUTATED ENV GLYCOPROTEIN AND THE USE THEREOF

(54) Titre : GENE ENV MUTE, GLYCOPROTEINE ENV MUTÉE ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a mutated *env* gene which codes for a mutated envelope glycoprotein of virus HIV-1. In relation to the *env* gene of a reference or primary infection primary isolate, said gene presents at least two mutations at the glycosylation sites which are preserved from one primary isolate to another. Each mutation consists in the replacement of an AAC or AAT codon which codes for an asparagine with a CAG or CAA codon which codes for a glutamine, the two mutations at least being selected from the following: (a) at least two mutations in the part of the *env* gene that codes for region C3 of the env protein; (b) at least one mutation in the part that codes for region C3 and at least one mutation in the part that codes for region V3; (c) at least one mutation in the part that codes for region C2 and at least one mutation in the part that codes for region V3 chosen from the glycosylation sites at codons 862-864 and 970-972; (d) at least one mutation in the part that codes for region C2 selected from the glycosylation sites at codons 667-669, 679-681, 700-702, 763-765, 844-846 and at least one mutation in the part that codes for region V3. Alternatively, the mutated *env* gene consists of any one of the following sequences: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10, or the complementary sequences thereof. The invention also relates to the mutated Env glycoprotein and the use of the gene and the glycoprotein in a pharmaceutical composition in order to produce antibodies and to evaluate a therapeutic agent.

(57) Abrégé : Gène env muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, ledit gène présente par rapport au gène env d'un isolat primaire de primo-infection, dit de référence, au moins deux mutations au niveau des sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire à un autre, chaque mutation consistant en le remplacement d'un codon AAC ou AAT qui code pour une asparagine par un codon CAG ou CAA qui code pour une glutamine, les deux mutations au moins étant choisies parmi les suivantes : (a) au moins deux mutations dans la partie du gène env codant pour la région C3 de la protéine env, (b) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C3 et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3, (c) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C2 et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau des codons 862-864 et 970-972, (d) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C2 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau des codons 667-669, 679-681, 700-702, 763-765, 844-846, et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3, ou le gène env muté consiste en l'une quelconque des séquences SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou leurs séquences complémentaires, Glycoprotéine Env mutée, et utilisation du gène et de la glycoprotéine dans une composition pharmaceutique, pour obtenir des anticorps et pour évaluer un agent thérapeutique.

WO 03/020755 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée :

- *avec rapport de recherche internationale*
- *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

GENE ENV MUTE, GLYCOPROTEINE ENV MUTEE ET UTILISATIONS

Le syndrome d'immunodéficience acquise (S.I.D.A) est une affection virale qui présente une importance majeure en Amérique, en Europe, en Afrique et en Asie. Les individus infectés présentent une immunodépression sévère et la maladie peut encore être fatale bien que des progrès aient été faits grâce à la trithérapie. La transmission de la maladie s'effectue le plus souvent par contact sexuel et par utilisation de stupéfiants par voie intraveineuse. La maladie est transmissible de la mère à l'enfant. Un des agents causals de cette maladie est le rétrovirus VIH-1. Le génome du VIH-1 a été caractérisé de façon complète par Wain-Hobson et al., 1985 (22) ; Ratner et al., 1985 (23) ; Muesing et al., 1985 (24) ; Sanchez-Pescador et al., 1985 (25). Les trois parties les plus importantes du génome du VIH-1 sont les gènes *gag*, *pol* et *env*. La séquence du gène *env* code pour la protéine Env qui est synthétisée sous la forme d'un précurseur glycosylé, la gp160, qui est clivé par une endoprotéase cellulaire en deux sous unités, la protéine de surface gp120 et la protéine transmembranaire gp41. Ces deux sous unités restent liées de manière non covalente et la glycoprotéine native ancrée à la membrane cytoplasmique ou à l'enveloppe virale est très probablement un trimère ou éventuellement un tétramère du complexe gp120/gp41, stabilisé par des interactions au niveau des domaines extracellulaires des sous-unités gp41 (McInerney T.L et al., 1998 (5)). De par sa complexité structurale, la protéine Env est très difficile à purifier dans sa conformation native.

La mise au point d'un vaccin contre le VIH-1 a focalisé des efforts internationaux soutenus depuis la découverte du virus en 1983. Aujourd'hui, après presque 20 années de recherches actives, non seulement il n'existe pas de vaccin crédible, mais de nombreuses équipes cherchent encore à identifier des approches vaccinales

raisonnablement utilisables. Les stratégies classiques, à savoir l'utilisation de souches atténuées ou de virus inactivés ont été exclues ; les risques liés à l'emploi d'un rétrovirus répliquatif étant trop importants pour envisager une utilisation chez l'homme. Comme il n'existe aucun cas documenté de guérison naturelle de l'infection chez l'homme, les facteurs immunitaires de la protection n'ont pas pu être identifiés avec assurance. Pour un certain nombre d'infections virales, comme par exemple le virus de la rougeole ou le virus de la grippe, le principal facteur de protection est l'induction d'une réponse humorale neutralisante, c'est-à-dire d'anticorps dont la fixation sur la particule virale bloque l'entrée dans la cellule cible. Pour cette raison, les efforts pour le développement d'un vaccin contre le VIH-1 se sont concentrés initialement sur cette approche visant à induire des anticorps neutralisants. Dans de telles stratégies vaccinales, la glycoprotéine d'enveloppe virale (Env) constitue un immunogène de choix, parce qu'elle est la principale, voire l'unique, cible de la réponse neutralisante. Pourtant, les essais de vaccination réalisés avec les protéines d'enveloppe ont donné lieu jusqu'ici à des résultats très décevants. Avec de tels immunogènes, il est en effet possible d'induire des titres neutralisants élevés vis à vis des souches de laboratoire dans les modèles animaux du chimpanzé et du macaque, ainsi que chez des volontaires sains. Cependant, ces anticorps neutralisants efficaces contre les souches adaptées à la culture sur les lignées lymphocytaires T transformées (souches de laboratoires ou TCLA) ne protègent pas de l'infection par les virus primaires qui sont impliqués dans la transmission du VIH-1 (Moore J.P. and D.D. Ho, 1995 (1)).

La distinction entre les souches adaptées au laboratoire et les isolats primaires obtenus par culture de courte durée sur les cellules T primaires est apparue

en 1995 et s'est précisée avec la découverte des corécepteurs du VIH-1 dont les deux principaux sont les récepteurs à chimiokines CCR5 et CXCR4. La grande majorité des virus primaires utilisent le corécepteur CCR5 lors de leur entrée dans la cellule cible, en plus du récepteur CD4 commun à tous les virus. L'adaptation aux lignées T lymphoïdes se traduit par la perte de la capacité à utiliser le CCR5 et l'acquisition de la capacité à utiliser le CXCR4, si le virus ne le possède pas déjà (Trkola A. et al, 1996 (2)). L'autre différence fondamentale entre les deux types de virus est d'ordre immunologique : les isolats primaires sont, d'une manière générale, beaucoup plus résistants que les souches de laboratoire à la neutralisation par les anticorps et les formes solubles du CD4. En effet, des épitopes comme le site de fixation au récepteur CD4 et la boucle V3 sont peu accessibles sur les protéines Env des isolats primaires, alors qu'ils sont exposés à la surface des virus adaptés à la culture. Par conséquent, les anticorps spécifiques de ces déterminants antigéniques neutralisent efficacement les souches adaptées mais pas les isolats primaires (1). De plus, la résistance des isolats primaires à la neutralisation est indépendante de l'usage différentiel de corécepteurs entre les souches adaptées et primaires. Les rares isolats primaires qui n'utilisent que le CXCR4 comme corécepteur sont aussi difficiles à neutraliser que ceux utilisant le CCR5. Par ailleurs, dans les modèles animaux, il est effectivement possible d'obtenir une protection contre les souches adaptées de laboratoire, mais celle-ci reste limitée à la souche autologue et à un petit nombre de variants qui sont proches. La réponse neutralisante demeure inefficace contre les souches hétérologues, même s'il s'agit de variants adaptés à la culture. Cette protection limitée est due probablement à l'induction d'anticorps dirigés contre la boucle V3 qui est une région hypervariable de la protéine d'enveloppe. En utilisant des

mélanges d'immunogènes issus d'isolats différents, il a été possible d'élargir la spécificité de la réponse immunitaire ; cependant une protection à large spectre, couvrant plusieurs sous types, n'a jamais pu être induite
5 (Girard, M. et al., 2000 (3)).

Face à cette situation, plusieurs équipes se sont focalisées sur l'induction d'une immunité cellulaire spécifique du VIH-1. En effet, il est possible d'obtenir chez les vaccinés humains, comme dans les modèles animaux,
10 des réponses cellulaires à base de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) capables de tuer les cellules infectées ou d'y bloquer la réplication du VIH-1 par sécrétion de facteurs suppresseurs. Cependant, on ne parvient pas à induire de réponses CTL chez plus de 30 à 40% des vaccinés
15 et les réponses obtenues restent souvent dirigées contre un nombre d'épitopes trop restreints.

Une troisième voie, encore peu explorée, est l'induction d'une immunité muqueuse. Des résultats peu nombreux indiquent qu'une transsudation d'immunoglobulines
20 IgG neutralisantes et une sécrétion d'IgA pourraient jouer un rôle dans l'exclusion du virus à travers les épithéliums.

Les particularités du VIH-1, à savoir la réplication dans les cellules du système immunitaire et
25 l'échec initial de la réponse immunitaire antivirale chez les sujets infectés, soulignent la nécessité de développer de nouvelles approches qui doivent viser à induire des anticorps qui se fixent sur les épitopes de neutralisation conservés entre les différents sous types et présents sur
30 les glycoprotéines d'enveloppe des virus primaires.

Pour cela, les inventeurs se sont fixés plusieurs impératifs pour l'obtention d'un vaccin préventif efficace. Il faut utiliser de manière impérative des glycoprotéines d'enveloppe issues d'isolats primaires et
35 non des souches de laboratoire TCLA. Il faut s'assurer de présenter cette protéine au système immunitaire dans sa

conformation native oligomérique. Il faut identifier de nouveaux épitopes de neutralisation à large spectre en raison de l'extraordinaire capacité d'adaptation des virus primaires à muter pour résister à la neutralisation par un anticorps. En effet, dans le modèle de la souris SCID humanisée, une tentative thérapeutique consistant en l'administration d'un mélange des trois anticorps IgG1b12, 2G12 et 2F5 a sélectionné, en l'espace d'une semaine, une sous population virale résistant à la neutralisation par chacun des trois anticorps (Poignard P. et al., 1999 (5)).

La protéine d'enveloppe d'HIV-1 est fortement glycosylée (50% de la masse totale). Les sucres présents à sa surface assurent entre autres une protection vis-à-vis de la réponse neutralisante (Reitter J.N. et al., 1998 (6)). De nombreuses études ont montré le rôle que jouaient ces résidus dans l'infectivité ou la protection. Cependant, ces études, loin d'être systématiques, ont toujours pris en compte les sites de glycosylation soit indépendamment les uns des autres soit sur des éléments structuraux particuliers comme les boucles variables V1, V2, V3 ou les extrémités N-terminale et C-terminale de la protéine (6-8).

En 1998, un modèle de structure de gp120 a été proposé par Kwong après cristallisation d'une molécule délétée de la majorité de ses boucles variables et complexée avec le CD4s et le Fab (fragment liant l'antigène) de l'anticorps 17b (Kwong P.D et al., 1998 (9)). Curieusement, peu de travaux ont été fait sur la disposition des sites potentiels de glycosylation à la surface de la molécule oligomérique. On peut citer les travaux de Zhu X. et al., 2000 (10) qui propose un modèle pour la forme totalement glycosylée de la gp120 et ceux de Whyatt R. et al., 1998 (11) concomitant aux travaux de cristallisation.

Ainsi, selon le document WO-A-99/24464, les auteurs ont identifié, à partir de la structure

cristallisée de la protéine Env du VIH-1 délétée des boucles V1/V2, les différents sites de glycosylation susceptibles d'interagir au niveau d'un même épitope de neutralisation et ont obtenu des mutants correspondants. 5 Ceux-ci n'ont néanmoins été obtenus qu'à partir de souches de laboratoire, dont on a dit précédemment qu'elles ne sont plus appropriées à la recherche d'un vaccin efficace.

Et, à l'exception de Kwong, (Kwong P.D et al., 2000 (12)) tous les résultats ont essentiellement été 10 obtenus sur des souches TCLA. Or, les virus adaptés en culture ont des différences épitopiques très marquées par rapport aux virus primaires et les études de Zhu et Whyatt ne reflètent pas la réalité exacte de la structure antigénique de la gp120 native du VIH-1.

15 Les inventeurs ont tout d'abord émis et vérifié l'hypothèse qu'au niveau du trimère d'hétéro-dimères présent à la surface des cellules infectées ou du virus, les sites potentiels de glycosylation les plus conservés sont regroupés de façon à protéger des éléments 20 conformationnels importants pour le virus.

Pour tester cette hypothèse ils ont accompli un travail considérable. Ils ont positionné tous les sites potentiels de glycosylation présents sur les séquences d'enveloppes de 13 isolats primaires de primo-infection 25 HIV-1 (133, 146, 153, 159, 160, 374, 384, Qz, 120, 309, 355, 373, 426) et à titre de comparaison sur 5 souches TCLA (MN, HXB2, OYI, RF SF2). Les douze séquences primaires de primo-infection (à l'exception de QZ) ont été isolées et caractérisées dans le laboratoire à partir de 30 PBMC (cellules mononucléées sanguines du sang périphérique) de patients en phase de primo-infection hospitalisés à l'hôpital de la Croix-rousse à Lyon (Ataman-Önal Y. et al., 1999 (13)). Le choix des primo-infections est justifié par le fait que le virus présent à 35 ce stade de la maladie est proche du virus qui a initié l'infection. Les sites potentiels de glycosylation qui

étaient conservés dans les 13 séquences de référence ont ensuite été repérés et les séquences correspondantes sélectionnées. Ces sites correspondent au motif protéique N.X.T/S dans lequel N signifie asparagine, X représente
5 n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline, T signifie thréonine et S signifie sérine. Les résultats de cette étude sont illustrés par le tableau 1.

Tableau 1 : alignement des sites potentiel de glycosylation sur 13 séquences d'isolats primaire (IP) de patients en primo-infection et 5 séquences de souche TCLA (délétées des boucles V1/V2)

régions	Aa	133	146	153	159	160	374	384	Qz	120	309	355	373	426	MN	HXB2	OYI	RF	SF2
C1	155	+																	
C2	190	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
I	223	+			+	+		+				+				+			+
I	227		+	+	+		+		+	+			+	+		+	+	+	
I	234	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I	255	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I	269	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
v	282		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V3	288		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I	294	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
v	324		+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
C3	326-331	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+		+	+
I	347 ou 348	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
v	353 ou 354	+		+	+	+	+	+	+		+		+		+				+
V4	377	+			+	+			+	+		+	+	+		+	+	+	+
I	383		+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+
I	387											+					+		
I	389	+	+	+		+	+	+		+		+	+	+	+	+		+	+
I	393			+	+	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+	
I	399	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+		+	+
v	405			+	+														
C4	428											+							
I	432								+					+					
I	436	+	+			+	+	+	+	+	+		+		+			+	+
I	442			+	+							+				+			
v	447	+	+											+			+		+
V5	451	+	+			+	+	+		+	+I			+					
I	453						+		+						+			+	+
I	457			+	+											+			
v	460				+														
	Sous Type	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	G	B	E	B	B	B	B	B
	Transmission	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HT	HT	HT	HT	HT	HM	HM	?	?	HM
	IP/TCLA	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	TC	TC	TC	TC	TC
	C.R.	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	X4	X4	X4	X4R5	X4R5

+ : sites de glycosylation conservés

5 Transmission : HM : homosexuelle ; HT : hétérosexuelle

Isolat primaire : IP ; souche TCLA : TC

Utilisation des co-récepteurs : CCR5 : R5 ; CXCR4 : X4 ; double tropisme : X4R5

10 NB : la numérotation des acides aminés est donnée par rapport à la séquence complète.

Les inventeurs ont ensuite sélectionné les sites de glycosylation les plus fortement conservés et ont positionné ces sites conservés sur la structure 3D de la gp120 (#PDB database : 1G9M) à l'aide du logiciel PDB-View (Glaxo-Welcome). Les sites enfouis dans la molécule ou présents dans le domaine interne de la gp120, domaine qui interagit avec la gp41 et donc est peu ou pas exposé à la surface de l'oligomère, ont été éliminés de l'étude. Chaque séquence a été analysée indépendamment. Cette analyse a montré que les sites conservés avaient une disposition comparable à la surface de la molécule, quelle que soit la séquence des isolats primaires.

Les inventeurs ont ensuite défini des «groupes» ou «clusters de glycosylation» qui correspondent à des regroupements des sites conservés à la surface de la gp120 d'un isolat primaire à un autre. Ces groupes étant définis, une liste de mutants de déglycosylation qui tient compte de ces résultats a été établie.

Un des groupes de glycosylation correspond à une région située à proximité du motif GPGS de la boucle V3 (groupe g14).

Un autre groupe (g112/g122) recoupe partiellement les sites de glycosylation qui définissent l'épitope neutralisant 2G12 (Trkolla A. et al., 1996 (14)).

Un troisième groupe est juxtaposé à une cavité où sont logés des acides aminés intervenant dans la liaison aux co-récepteurs (groupe 1112).

Un quatrième groupe est situé au niveau de 4 feuillets bêta anti-parallèles localisés à la jonction des deux principaux domaines de la gp120 (*Bridging-sheet*).

Un cinquième groupe est présent sur la face « silencieuse » de la gp120 (groupe 1113).

Les contrôles consistent soit en le gène d'enveloppe totalement déglycosylé pour la V1 (6) soit en une délétion totale des boucles V1V2.

En parallèle, et afin de valider la notion de « cluster » de glycosylation, deux mutants supplémentaires (g123 et g1123) ont été définis qui correspondent à des déglycosylations, non pas au sein d'un même cluster, mais
5 dans chaque différent « cluster » (une mutation par « cluster »).

Au moins une mutation a été effectuée sur les séquences sélectionnées obtenues à partir du patient 133 (PHI133, numéro d'accès AF041126). Chaque mutation
10 consiste en le remplacement de l'asparagine du site potentiel de glycosylation (NXS/T) par une glutamine et ceci avec l'aide d'un kit de mutagenèse dirigé selon les instructions du fabricant (Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagène). Chaque mutant a été cloné
15 dans le vecteur d'expression pCI (Promega) et séquencé entièrement afin de vérifier l'intégrité de la séquence après mutagenèse. La purification des plasmides mutants a été effectuée grâce au kit Nucleobond PC500 (Macherey-Nagel).

20 La figure 1 schématise la définition des clusters et la proximité de chaque site sur la molécule de gp120 cristallisée.

Le tableau 2 récapitule la nature et le positionnement de chaque mutation pour un mutant
25 déterminé. Dans le tableau 2, les séquences en acides aminés de référence sont la séquence de la protéine Env de l'isolat HIV-1 133 non mutée délétée et la séquence de la protéine Env de l'isolat HIV-1 133 non mutée complète. Les correspondances en acides aminés sont données dans le
30 tableau 2. La séquence en acides aminés de la protéine Env de l'isolat HIV-1 133 non mutée complète est identifiée en SEQ ID NO : 11 et la séquence nucléotidique correspondante du gène *env* de l'isolat HIV-1 133 non mutée (complète) est identifiée en SEQ ID NO : 1. Les séquences SEQ ID Nos 2 à
35 10 et SEQ ID Nos 12 à 20 qui sont listées ci-dessous correspondent respectivement aux séquences des gènes *env*

mutés complets et tronqués de l'isolat HIV-1 133 et aux
séquences des protéines Env mutées complètes et tronquées
de l'isolat HIV-1 133. La séquence de la gp160 est donnée
en référence à SEQ ID NO : 11. La séquence de la gp120
5 commence à l'acide aminé 1 et se termine à l'acide aminé
498 par référence à la SEQ ID NO : 11. La séquence de la
gp140 (qui correspond à la gp120 plus les domaines
extracellulaires de la gp41) commence à l'acide aminé 1 et
se termine à l'acide aminé 669 par référence à la séquence
10 SEQ ID NO : 11.

Tableau 2 : caractéristiques des différents mutants de la séquence d'enveloppe 133.

cluster/nom du mutant	mutations N->Q de l'acide aminé n° (a)/autres	mutations N->Q de l'acide aminé n° (b)/autres	régions de gp120
g1	243	389	V4
g11	243/231	389/377	V4/V4
g21	44	190	C2 (V1V2 stem)
g2	180-185	326-331	C3
g12	180-185/148	326-331/294	C3/V3
g112	180-185/148/201-208	326-331/294/347-354	C3/V3/C3
g1112	180-185/148/201-208/243	326-331/294/347-354/389	C3/V3/C3/V4
g22	180-185/201-208	326-331/347-354	C3/C3
g122	180-185/201-208/231	326-331/347-354/377	C3/C3/V4
g3	289	434	C4
g13	289/109	434/255	C4/C2
g113	289/109/123	434/255/269	C4/C2/C2
g23	289/123	434/269	C4/C2
g4	123	269	C2
g14	123/148	269/294	C2/V3
g123 (non cluster)	289/123/243	434/269/389	C4/C2/V4
g1123 (non cluster)	289/123/243/180-185	434/269/389/326-331	C4/C2/V4/C3
V1 deglyc.	V1 déglycosylée		V1
DV1V2	V1V2 délétion		V1V2
133 native	pas de mutation-native (contrôle +)		-
133 anti	pas de mutation-antisens (contrôle -)		-

(a) : d'après la séquence 133 délétée [9] (b) : d'après la séquence 133 complète.

Il est bien entendu qu'en fonction de l'isolat
5 primaire la position des sites de glycosylation conservés
peut varier de 1 à 8 acides aminés et l'invention englobe
ces variations de positionnement.

Le tableau 3 ci-dessous présente certains exemples de variation des sites de glycosylation et établit une récapitulation de tous les sites potentiels de glycosylation dans les gènes env des isolats primaires 5 133, 146, 153, 159, 160, 374 et 384. Les positions en acides aminés sont indiquées pour les séquences délétées selon Kwong et al. 1998. Chaque ligne du tableau correspond à un site potentiel, la correspondance entre les différentes positions a été déterminée par un 10 alignement des séquences délétées. Les sites de glycosylation conservés dans toutes les séquences sont soulignés.

Tableau 3 :

Sequence	133	146	153	159	160	374	384	mutants
no aa	9	-	-	-	-	-	-	g14
	<u>44</u>	<u>44</u>	<u>44</u>	<u>44</u>	<u>44</u>	<u>44</u>	<u>44</u>	
	77	-	-	77	77	-	77	
	-	81	81	81	-	82	-	
	<u>88</u>	<u>88</u>	<u>88</u>	<u>88</u>	<u>88</u>	<u>88</u>	<u>88</u>	
	<u>109</u>	<u>109</u>	<u>109</u>	<u>109</u>	<u>109</u>	<u>109</u>	<u>109</u>	
	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	
	-	136	-	-	136	136	136	
	-	142	142	142	142	-	142	
	<u>148</u>	<u>148</u>	<u>148</u>	<u>148</u>	<u>148</u>	<u>148</u>	<u>148</u>	g12/g112/g14
	180	178	-	178	178	178	178	
	<u>185</u>	<u>185</u>	<u>185</u>	<u>185</u>	<u>185</u>	<u>183</u>	<u>185</u>	g12/g112
	<u>201</u>	<u>202</u>	<u>202</u>	<u>201</u>	<u>201</u>	<u>201</u>	<u>201</u>	
	208	-	208	207	207	207	207	g112
	231	-	-	231	231	-	-	
	-	238	238	237	237	238	237	
	-	-	242	-	241	-	241	
	-	-	243	-	-	243	-	
	<u>243</u>	<u>244</u>	<u>247</u>	<u>247</u>	<u>248</u>	<u>247</u>	<u>247</u>	
	253	-	253	253	254	255	253	
	-	-	258	259	-	-	-	
	289	288	295	296	290	290	289	
	301	301	-	-	-	304	-	
	<u>306</u>	<u>304</u>	<u>311</u>	<u>311</u>	<u>306</u>	<u>307</u>	<u>305</u>	
	-	-	-	314	-	-	-	

Les inventeurs ont ensuite étudié les caractéristiques antigéniques et fonctionnelles de chacun de ces mutants et sélectionné les mutants qui présentent les meilleures caractéristiques dans une visée vaccinale
5 préventive. Les mutants g12, g112 et g14 ont été sélectionnés. Les résultats sont présentés dans les exemples et figures qui suivent.

La séquence SEQ ID NO: 2 représente la séquence nucléotidique du mutant g12 (gène *env*).

10 La séquence SEQ ID NO: 3 représente la séquence nucléotidique du mutant g12 tronquée qui code pour la gp120.

La séquence SEQ ID NO: 4 représente la séquence nucléotidique du mutant g12 tronquée qui code pour la
15 gp140.

La séquence SEQ ID NO: 5 représente la séquence nucléotidique du mutant g112 (gène *env*).

La séquence SEQ ID NO: 6 représente la séquence nucléotidique du mutant g112 tronquée qui code pour la
20 gp120.

La séquence SEQ ID NO: 7 représente la séquence nucléotidique du mutant g112 tronquée qui code pour la gp140.

La séquence SEQ ID NO: 8 représente la séquence
25 nucléotidique du mutant g14 (gène *env*).

La séquence SEQ ID NO: 9 représente la séquence nucléotidique du mutant g14 tronquée qui code pour la gp120.

La séquence SEQ ID NO: 10 représente la séquence
30 nucléotidique du mutant g14 tronquée qui code pour la gp140.

La séquence SEQ ID NO: 12 représente la séquence en acides aminés du mutant g12 (protéine Env).

La séquence SEQ ID NO: 13 représente la séquence
35 en acides aminés de la gp120 du mutant g12.

La séquence SEQ ID NO: 14 représente la séquence en acides aminés de la gp140 du mutant g12.

La séquence SEQ ID NO: 15 représente la séquence en acides aminés du mutant g112 (protéine Env).

5 La séquence SEQ ID NO: 16 représente la séquence en acides aminés de la gp120 du mutant g112.

La séquence SEQ ID NO: 17 représente la séquence en acides aminés de la gp140 du mutant g112.

10 La séquence SEQ ID NO: 18 représente la séquence en acides aminés du mutant g14 (protéine Env).

La séquence SEQ ID NO: 19 représente la séquence en acides aminés de la gp120 du mutant g14.

La séquence SEQ ID NO: 20 représente la séquence en acides aminés de la gp140 du mutant g14.

15 Les séquences gp120 et gp140 sont obtenues soit par troncature du gène, soit par insertion d'un codon stop et/ou un décalage de trame de lecture sans délétion du gène. Les formes gp120 et gp140 sont solubles, donc plus faciles à purifier et à administrer que la protéine Env
20 complète.

Ainsi, la présente invention a pour objet un gène env muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, ledit gène présentant par rapport au gène env d'un isolat primaire de primo-infection, dit de
25 référence, au moins deux mutations au niveau des sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire à un autre, chaque mutation consistant en le remplacement d'un codon AAC ou AAT qui code pour une asparagine par un codon CAG ou CAA qui code pour une glutamine, les deux mutations au
30 moins étant choisies parmi les suivantes :

(a) au moins deux mutations dans la partie du gène env codant pour la région C3 de la protéine env,

(b) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C3 et au moins une mutation dans la partie
35 codant pour la région V3,

(c) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C2 et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau des codons 862-864 et 970-972,

5 (d) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C2 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau des codons 667-669, 679-681, 700-702, 763-765, 844-846, et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3,

10 la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides, ou le gène env muté consiste en l'une quelconque des séquences SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10 ou leurs séquences complémentaires,

15 Un des intérêts des multiples mutants (au moins deux mutations) selon l'invention réside dans la diminution de la probabilité d'avoir des mutations compensatoires qui conduiraient à retrouver un phénotype sauvage.

20 Les mutations préférentielles selon l'invention sont les suivantes.

Selon les mutations (a), au moins une mutation est effectuée au niveau des codons 976-978, 991-993 de la partie codant pour la région C3 et au moins une mutation
25 est effectuée au niveau des codons 1039-1041 ou 1060-1062 de la partie codant pour la région C3, la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides. De préférence, le gène consiste en une séquence choisie parmi les séquences
30 identifiées en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 et SEQ ID NO: 23 ou leurs séquences complémentaires.

Selon les mutations (b), au moins une mutation est effectuée au niveau des codons 976-978, 991-993, 1039-1041 ou 1060-1062 de la partie codant pour la région C3 et
35 au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 880-882 de la partie codant pour la région V3, la position

d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides ; selon cette variante, le gène comprend au moins trois mutations, à savoir au moins deux mutations dans la partie codant pour la région C3 et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3 :

de préférence, ces mutations sont effectuées au niveau des codons 976-978, 991-993 et 880-882, la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides ; avantageusement, la séquence du gène ainsi muté consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 et SEQ ID NO:4 ou leurs séquences complémentaires, ou

au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 976-978 ou 991-993, au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 880-882, et au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 1039-1041 ou 1060-1062 ; préférentiellement, les mutations sont effectuées au niveau des codons 976-978, 991-993, 880-882, 1039-1041 et 1060-1062 ; avantageusement, la séquence du gène ainsi muté consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 et SEQ ID NO: 7 ou leurs séquences complémentaires,

étant entendu que la position d'au moins l'un quelconque desdits codons précité peut varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

Selon les mutations (c), au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 805-807 de la partie codant pour la région C2, la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

Selon les mutations (d), au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 880-882 de la partie codant pour la région V3, la position d'au moins l'un

quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

La séquence du gène muté peut aussi consister en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en
5 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10 ou leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne également une glycoprotéine Env mutée du virus VIH-1, laquelle glycoprotéine présente par rapport à une protéine Env native d'un isolat primaire
10 de primo-infection, dit de référence, au moins deux mutations au niveau des sites de glycosylation conservés de ladite protéine de référence, d'un isolat primaire à un autre, chaque mutation consistant en le remplacement d'une asparagine par une glutamine, les deux mutations au
15 moins étant choisies parmi les suivantes :

(a') au moins deux mutations dans la région C3 de la protéine Env,

(b') au moins une mutation dans la région C3 et au moins une mutation dans la région V3,

20 (c') au moins une mutation dans la région C2 et au moins une mutation dans la région V3 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau de l'acide aminé 288 ou 324,

(d') au moins une mutation dans la région C2
25 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau de l'un quelconque des acides aminés 223, 227, 234, 255, 282, et au moins une mutation dans la région V3,

la position desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un
30 autre pouvant varier d'un à huit acides aminés,

ou la glycoprotéine Env mutée consiste en l'une quelconque des séquences ou le gène env muté consiste en l'une quelconque des séquences SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20.

La position des acides aminés des sites de glycosylation mutés est donnée par référence à la séquence de la protéine Env native.

Les mutations préférentielles selon l'invention
5 sont les suivantes.

Selon les mutations (a'), au moins une mutation est effectuée au site de glycosylation au niveau de l'acide aminé 326 ou 331 et au moins une mutation est effectuée au site de glycosylation au niveau de l'acide
10 aminé 347 ou 354, la position desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés. De préférence, la glycoprotéine consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID
15 NO: 21, SEQ ID NO: 22 et SEQ ID NO: 23.

Selon les mutations (b'), au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 326 ou 331 et au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 294, la position d'au moins l'un quelconque desdits
20 sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre, pouvant varier d'un à huit acides aminés ; selon une variante, la glycoprotéine comporte au moins trois mutations, de préférence au moins deux mutations dans la région C3 et au moins une mutation
25 dans la région V3 :

De préférence, ces mutations sont effectuées au niveau des acides aminés 326, 331 et 294 ;
avantageusement, une glycoprotéine Env mutée de l'invention consiste en une séquence choisie parmi les
30 séquences identifiées en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 et SEQ ID NO: 14 ; ou

au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 326 ou 331, au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 347 ou 354 et au
35 moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 294, ; avantageusement, les mutations sont

effectuées au niveau des acides aminés 326, 331, 294, 347 et 354 ; mieux encore, une glycoprotéine Env mutée de l'invention consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 et
5 SEQ ID NO: 17,

étant entendu que la position desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés.

10 Selon les mutations (c'), au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 269 de la région C2.

Selon les mutations (d'), au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 294 de la région
15 V3.

Une glycoprotéine Env mutée de l'invention peut consister en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 et SEQ ID NO: 20.

20 L'invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique comprenant :

(i) au moins un gène muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée gp120 du virus VIH-1, ledit gène muté étant choisi parmi l'un quelconque des
25 gènes décrits ci-dessus et étant placé sous le contrôle de séquences de régulation permettant son expression dans une cellule hôte,

un véhicule pharmaceutiquement acceptable,
et

30 de manière facultative un agent additionnel qui facilite la pénétration dudit gène muté dans ladite cellule et/ou qui permet de cibler ladite cellule, ou

(ii) au moins le gène muté identifié en (i) cloné dans un vecteur viral recombinant.

35 Parmi les séquences de régulation, on peut citer le promoteur intermédiaire/précoce du CMV humain

(« intermediate/early CMV human promotor ») et le gène rev du VIH-1.

Si souhaité, on peut cibler lesdites cellules hôtes ou un compartiment cellulaire déterminé desdites
5 cellules hôtes et pour ce faire il est possible de coupler au principe actif, à savoir l'ADN muté de l'invention, au moins un agent de ciblage. Par agent de ciblage, on entend une molécule chimique ou biologique qui permet de cibler *in vivo* ladite cellule hôte. Il peut, entre autres, s'agir
10 d'un ligand spécifique, d'un anti-ligand naturellement présent au niveau de la cellule hôte ou du compartiment cellulaire à cibler, en particulier présent à la surface de ladite cellule hôte, et on peut citer à titre d'exemple les anticorps comme ligands et les antigènes comme anti-
15 ligands. Ainsi, si un anticorps est couplé au principe actif et est spécifique d'un antigène de surface de la cellule hôte, il agira comme agent de ciblage de ladite cellule hôte par l'intermédiaire de la formation spécifique d'un complexe anticorps/antigène.

20 Par agent qui facilite la pénétration dudit gène muté dans une cellule hôte, on entend, entre autres, des agents tels que la bupivacaine et la cardiotoxine.

Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend, entre autres, les liposomes, les virosomes, les
25 nanoparticules, les microparticules (exemple : les billes d'or), les iscoms.

Pour le vecteur viral recombinant, on peut citer à titre d'exemple le MVA (Modified Vaccinia Ankara), les alphavirus, le SFV (Semliki Forest Virus), les adénovirus,
30 le AAV (Adeno-Associated Virus).

Les compositions pharmaceutiques définies ci-dessus sont des compositions vaccinales à ADN particulièrement avantageuses, en particulier par rapport aux compositions vaccinales « classiques » à base de
35 protéine recombinante. En effet, l'utilisation à visée vaccinale de protéines recombinantes est un système lourd

et onéreux, notamment parce qu'il exige de très importantes étapes de purification des antigènes recombinants. De plus, une des difficultés rencontrées est d'obtenir une persistance du vaccin suffisamment longue
5 pour maintenir une bonne mémoire immunitaire. Au contraire, la méthode de vaccination par l'ADN, dont les avantages sont inhérents aux propriétés intrinsèques de l'ADN, est simple et peu coûteuse et est effectuée simplement par injection intramusculaire ou intradermique.
10 De plus, il convient de noter que :

- les vaccins à ADN sont non infectieux/non réplicatifs,
- que du fait que l'immunisation par l'ADN est une forme de transfection *in vivo*, l'antigène viral est
15 exprimé dans les cellules mammifères sous sa conformation native,
- comme dans le cas d'une infection virale, une large réponse immune, à la fois humorale et cellulaire est induite, et que
- 20 - de plus, les vaccins à ADN peuvent facilement être combinés en raison de leur homogénéité physico-chimique.

Mais, l'invention n'est pas limitée à une composition vaccinale à ADN telle que définie ci-dessus et
25 concerne également une composition pharmaceutique comprenant :

- au moins une glycoprotéine d'enveloppe mutée gp120 du virus VIH-1, ladite glycoprotéine mutée étant choisie parmi l'une quelconque des glycoprotéines décrites
30 ci-dessus,
- un véhicule et/ou excipient et/ou adjuvant et/ou diluant pharmaceutiquement acceptable.

Une telle composition vaccinale préparée est injectable, c'est-à-dire en solution liquide ou en
35 suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique, c'est à dire la

glycoprotéine mutée, peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient ou principe actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents mouillants ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxyde d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations, les polymères cationiques, les nanoparticules de polymères cationiques ou leurs variants (polyacide lactique, polyacide lactique - coglycoside).

Le vaccin est administré conventionnellement par injection, par exemple intramusculaire.

Par « véhicule pharmaceutiquement acceptable », on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co. Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est de préférence isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont également données dans Remington's Pharmaceutical Sciences précité.

La présente invention concerne également un procédé pour induire une réponse humorale et/ou cellulaire améliorée contre le virus VIH-1 chez un animal mammifère selon lequel :

- on administre à un animal mammifère par injection intramusculaire ou intradermique une quantité, suffisante pour être efficace, d'une composition vaccinale à ADN, comprenant au moins le gène muté qui code pour une protéine mutée de l'invention telle que définie précédemment, ou

- on administre à un animal mammifère par injection intramusculaire ou intradermique une quantité, suffisante pour être efficace, d'une composition vaccinale comprenant au moins la protéine mutée de l'invention telle
5 que définie ci-dessus.

Dans le cas de vaccins ADN, la concentration en acide nucléique dans la composition utilisée pour une administration *in vivo* est d'environ 100 µg/ml à 10 mg/ml, de préférence 1 mg/ml.

10 La quantité de protéine administrée est fonction de l'addition ou non d'un adjuvant, mais sera généralement comprise entre 10 et 50 µg/ml de protéine.

Le vaccin est administré à une dose déterminée en une ou plusieurs injection(s) par voie intramusculaire ou
15 intradermique, suivie(s) de rappel(s), si nécessaire. L'effet immunisant du vaccin est suivi par un dosage d'anticorps anti-VIH-1 chez l'individu ou l'animal vacciné.

L'administration d'acide(s) nucléique(s) ou de
20 protéine(s) d'intérêt ou de leur(s) fragment(s), seuls ou en combinaison, est utilisée pour la prophylaxie et/ou la thérapie. Quand un ou des acide(s) nucléiques ou leurs fragments ou une ou des protéine(s) ou leurs fragments sont administrés, leur caractéristique est de ne pas
25 présenter la virulence du VIH-1 mais d'avoir la propriété d'induire une réponse immunitaire, humorale et/ou cellulaire, chez l'individu ou l'animal auquel ils ou elles sont administrés. Quand il s'agit de protéine(s), celles ci peuvent être obtenues par des techniques
30 synthétiques ou de recombinaison génétique ou par modification de protéine(s) naturelles par des traitements chimiques ou physiques.

La ou les protéine(s) ou leurs fragments, candidate(s) pour la formulation d'un vaccin sont
35 identifiées et analysées dans un test fonctionnel pour s'assurer qu'elles ont perdu leur toxicité et pour

vérifier leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et, (ii) en mesurant, entre autres, le taux d'anticorps circulants dirigés contre la protéine naturelle et leur capacité à neutraliser des isolats primaires. Ces formes modifiées sont utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standardisées avec des adjuvants appropriés.

L'invention concerne encore :

- un procédé pour obtenir des anticorps selon lequel on immunise un animal mammifère, tel que souris ou rat ou singe, avec au moins un gène muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, ledit gène muté étant choisi parmi l'un quelconque des gènes décrits précédemment et étant placé sous le contrôle de séquences de régulation permettant son expression *in vivo* et les anticorps susceptibles d'être obtenus par ce procédé, et
- un procédé pour obtenir des anticorps selon lequel on immunise un animal mammifère, tel que souris ou rat ou singe, avec au moins une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, ladite glycoprotéine mutée étant choisie parmi l'une quelconque des glycoprotéines décrites précédemment et les anticorps susceptibles d'être obtenus par ce procédé.

Par anticorps, on entend les anticorps polyclonaux, les anticorps monoclonaux, les anticorps transmembraires et les anticorps humanisés ou des fragments desdits anticorps. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production

d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp. 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Pour la production
5 d'anticorps monoclonaux, l'immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund.
10 Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les
15 plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que
20 soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou la chromatographie d'affinité (protéine A ou G). Un
25 nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est
30 bien connue de l'homme du métier.

Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre
35 lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente

invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés (polypeptide transmembranaire) permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature.

Les formes « humanisées » d'anticorps non humains, par exemple murins, sont des anticorps chimères qui comprennent une séquence minimale dérivée d'une immunoglobuline non humaine. Pour la plupart, les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines (anticorps récepteur) dans lesquelles des résidus d'une région hypervariable du récepteur sont remplacés par des résidus d'une région hypervariable d'une espèce donneur (anticorps donneur) non humaine, telle que souris, rat, lapin ou primate non humain, ayant la spécificité, l'affinité et la capacité souhaitées. Dans certains cas, les résidus (FR) de la région Fv de l'immunoglobuline humaine sont remplacés par des résidus correspondants non humains. De plus, les anticorps humanisés peuvent comprendre des résidus qui ne sont pas trouvés dans l'anticorps receveur ou dans l'anticorps donneur. Ces modifications sont effectuées pour améliorer les performances de l'anticorps. En général, l'anticorps humanisé comprendra au moins et de préférence deux domaines variables, dans lesquels tout ou à peu près tout des boucles hypervariables correspondent à une immunoglobuline non humaine et tout ou à peu près tout des régions FR seront celles d'une immunoglobuline humaine. Les anticorps humanisés facultativement pourront aussi comprendre au moins une partie d'une région constante (Fc) d'une immunoglobuline, telle qu'une immunoglobuline humaine (Jones et al., Nature 321 : 522-525 (1986) ;

Reichmann et al., Nature 332 : 323-329 (1988) ; et Presta et al., Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593-596 (1992).

Par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)₂, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

Ces anticorps peuvent être incorporés dans une composition pharmaceutique, en particulier quand il s'agit d'anticorps neutralisants, pour répondre à une infection virale par le VIH-1 et l'invention englobe une telle composition pharmaceutique.

Enfin, l'invention concerne un procédé d'évaluation d'un agent thérapeutique, selon lequel on administre à un animal au moins un gène muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1 tel que décrit précédemment et on réalise :

- un dosage d'anticorps spécifiques de la gp120 mutée, et/ou

- un dosage des anticorps neutralisants spécifiques de la glycoprotéine mutée ou native qui vont induire une diminution de l'infectivité du virus, et/ou

- un dosage de la réponse immune cellulaire induite contre la gp120 mutée par exemple par un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T « helper » spécifique(s) de la glycoprotéine mutée.

Pour une meilleure compréhension de la partie expérimentale qui va suivre, il convient de revenir en quelques lignes sur le mécanisme d'infection du VIH-1. Au cours de l'infection, la gp120 se fixe au récepteur CD4. Suite à cette interaction, la gp120 subit un réarrangement structural libérant des épitopes dits « CD4 induits » qui permettent la fixation du co-récepteur. La fixation du CD4

puis celle du co-récepteur sont des événements pré-requis pour l'ancrage du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane cellulaire et donc l'infection de la cellule.

Figures.

5 La figure 1 schématise la définition des clusters et la proximité de chaque site sur la molécule de gp120 cristallisée.

 La figure 2 représente la détection de gp160 □ et de gp120 □ dans chaque lysat cellulaire pour chacun des
10 mutants réalisés et pour les contrôles.

 La figure 3A représente l'antigénicité testé en ELISA dans les lysats cellulaires vis à vis d'un pool de sérums HIV positif et la figure 3B représente l'antigénicité testé en ELISA dans les surnageants de
15 culture vis à vis du pool de sérums HIV positif.

 La figure 4A représente la quantité de CD4s détectée dans les lysats cellulaires et la figure 4B représente la quantité de CD4s détectée dans les surnageants de culture.

20 La figure 5A représente la reconnaissance de l'épitope F105 testée en ELISA dans les surnageants de culture et la figure 5B représente la reconnaissance de l'épitope F105 testée en ELISA dans les lysats cellulaires.

25 La figure 6A représente la reconnaissance de l'épitope CG10 en présence de CD4 testée en ELISA dans les lysats cellulaires et la figure 6B représente la reconnaissance de l'épitope CG10 seule (■) et en présence de CD4 (□) testée en ELISA dans les surnageants de culture.

30 La figure 7A représente la reconnaissance de l'épitope 17b seul (□) et en présence de CD4 (□) testée en ELISA dans les lysats cellulaires et la figure 7B représente la reconnaissance de l'épitope 17b seul (□) et en présence de CD4 (□) testée en ELISA dans les
35 surnageants de culture.

La figure 8 illustre la neutralisation du virus FR (virus primaire X4) sur des cellules Hela P4PCCR5 par le sérum de souris immunisées par différentes constructions (Exemple 4).

5 La figure 9 illustre l'infection par des pseudo-particules portant les glycoprotéines mutées identifiées dans le tableau 2, de cellules GHOST-CCR5 et GHOST-CXCR4.

La figure 10 illustre la neutralisation des pseudo-particules portant les glycoprotéines mutées par un
10 sérum humain CRI/LY neutralisant.

Exemples.

Exemple 1 : Expression et clivage.

Des cellules 293T (cellules épithéliales de rein)
15 sont co-transfectées par chacune des constructions PCI-env et le plasmide d'expression PCI-rev à l'aide du kit Lipofectamine-Plus (Gibco-BRL) selon les instructions du fabricant. Rev est une protéine de régulation de HIV-1 qui joue un rôle important dans l'expression de la
20 protéine d'enveloppe. Quarante-huit heures après transfection, le surnageant de culture et les cellules sont récupérées et testés en Western-blot avec un anticorps polyclonal de mouton anti-gp120 (Biogenesis) dilué au 1/5000. Pour cela, les échantillons sont déposés
25 sur un gel dénaturant d'acrylamide 8%. Après séparation, les échantillons sont transférés sur une membrane de PVDF (ImmobilonP, Amersham) selon les instructions du fabricant. Pour les lysats, la normalisation des échantillons a été faite avec un anticorps monoclonal
30 anti-Actine dilué au 1/5000 (A4700, Sigma) et anti-Rev 2D4D10 dilué au 1/5000 (bioMérieux). Pour les surnageants la normalisation a été faite d'après le taux d'albumine sérique du milieu de culture. La révélation des blots est effectuée à l'aide du kit ECF (Amersham) et les bandes
35 révélées sont quantifiées sur Typhoon 8600 grâce au logiciel ImageQuant. Toutes les constructions expriment

une protéine qui réagit avec le polyclonal anti-gp120. La migration des protéines mutantes est affectée par la perte d'une ou de plusieurs glycosylation. La baisse de gp120 détectée dans le lysat cellulaire est associée à l'augmentation du nombre de mutations (figure 2). Parfois, la bande spécifique est totalement absente (mutants g1112, g122, g13, g113, g14, g123, g1123 et DV1V2). Elle est également absente du surnageant de culture correspondant : on peut penser que le taux de clivage est affecté. Moulard (15) a décrit ce phénomène qu'il associe à une mauvaise translocation dans le RE et/ou un défaut de repliement empêchant l'accessibilité du site de coupure. A *contrario*, Pour le mutant g14, une quantité importante de gp120 est détectée dans le surnageant (environ 8x plus que la protéine native, à quantité de protéines normalisées) alors que celle-ci n'est pas détectée dans le lysat cellulaire. Il semble donc que les mutations présentes sur ce clone affectent les interactions liant entre-elles les sous-unités de l'enveloppe et non pas le taux de clivage de la gp160. Le taux de clivage pour les simples mutants est en général comparable à celui observé pour l'enveloppe native (excepté pour le mutant g21). Il est intéressant de noter qu'en comparaison le mutant correspondant à la déglycosylation totale de la boucle V1 semble peu affectée par la perte de 3 glycosylations.

Exemple 2 : Aptitude des mutants à former des syncytia *in vitro*.

Quarante-huit heures après transfection, les cellules 293T qui expriment les différents mutants sont repiqués au 1/10 et mises en présence de cellules GHOST-CCR5 ou -CXCR4 à 50% de densité.

Après 16 heures de co-culture, les cellules sont fixées 15 minutes au glutaraldéhyde 0,5% puis les noyaux et les cytoplasmes sont colorés en May-Grünwald/Giemsa.

L'observation et le comptage des syncytia formés sont appréciés par observation au microscope optique inversé.

Pour les GHOST-CCR5, la capacité à induire des syncytia est réduite quand le nombre des mutations est augmenté. Elle est nulle pour les clones qui ne sont pas clivés (g113, g1123 et peut-être g1112). Ce résultat confirme les résultats précédents et donne une indication sur le maintien de la fonctionnalité des différentes enveloppes après mutation. Les constructions n'induisent pas la formation de syncytia sur des cellules indicatrices CXCR4 comme cela a pu être mis en évidence par Pollakis (16) après déglycosylation partielle de la boucle V3 de la gp160 ADA.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Aptitude des mutants de l'enveloppe à former des syncytia *in vitro*.

constructions	G1	g11	g21	g2	g12	g112	G1112	G22	g122	g3	g13	g113	g23	g4	g14
FS CCR5	++	++	+	++	+	+	?	++	+	++	+	-	++	++	+
FS CXCR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
constructions	G123	g1123	DV1V2	dgV1	natif	anti	HxB2								
FS CCR5	+	-	-	++	++	-	-								
FS CXCR4	-	-	-	-	-	-	+								

FS CCR5 : formation syncytia CCR5 FS CCR4 : formation syncytia CCR4

Antigénicité vis-à-vis d'un pool de sérums HIV positif (cf. figure 3).

Les lysats et les surnageants ont été testés en ELISA de capture avec un pool de sérums HIV+ provenant de l'hôpital de la Croix-Rousse à Lyon. Ce pool de sérums est constitué de 2 échantillons sous-types B et d'un échantillon sous-type C. Tous les résultats d'ELISA

correspondent à la moyenne de 2 expériences en duplicate.
Le format du test est le suivant:

- Anticorps de capture : D7324 (dirigé contre le site de clivage alterne situé dans la région C5; Aalto) à 1µg/ml en PBS1x ou 12G10B11 (dirigé contre la gp41, bioMérieux) à 5µg/ml en PBS1x ; incubation la nuit à 6°C.

- Saturation par PBS1x-Tween 0,1%-lait écrémé en poudre 3% ; incubation 1heure à 22°C.

- Lysats dilués au 1/10 en PBS-NP40 1%-BSA 20µg/ml ou surnageants au pur ; incubation 2 heures à 22°C.

- Pool de sérums HIV+ dilué au 1/100 en PBS1x-Tween 0,1%-BSA 20µg/ml ; incubation 1 heure à 22°C.

- Conjugué anti-Fc IgG humain couplé à la peroxydase (Jackson) dilué au 1/5000 en PBS1x-Tween 0,1%-BSA 20µg/ml ; incubation 30 minutes à 22°C.

- Révélation par un mélange de 20mg OPD (Pierce) et de 10ml de Color2 (BioMérieux) ; incubation de 15 minutes à 22°C avant lecture à 492 nm sur un lecteur de plaques (Biorad).

Entre chaque incubation 4 lavages au PBS1x-Tween 0,1% sont effectués avec un laveur de plaques Biorad.

Les surnageants sont capturés par l'anticorps D7324 ; les lysats sont capturés soit par le D7324, soit par le 12G11B10. Ce dernier a principalement été utilisé car l'épitope D7324 est peu exposé sur les gp160 non clivées et le signal détecté dépend alors du taux de clivage des différents mutants.

Les résultats montrent que la perte d'antigénicité corrèle avec le nombre de mutations. Les résultats sur les lysats (coating 12G11B10) et sur les surnageants coïncident et confirment l'absence de gp120 dans les surnageants pour les mutants g113 et g1123.

Exemple 3 : Reconnaissance**Reconnaissance de l'épitope 2G12.**

2G12 est un anticorps monoclonal humain obtenu par électrofusion de PBL HIV+ et de cellules CB-F7 (17).
5 Il a un pouvoir neutralisant à large spectre sur des isolats primaires et certains virus TCLA. L'épitope reconnu par cet anticorps est discontinu et couvre principalement les régions V3 et V4 ainsi que certains sucres présents dans ces régions. La reconnaissance de
10 2G12 a été testée en ELISA sur les lysats cellulaires et sur les surnageants des différents mutants. Le format du test est le même que le précédent, excepté pour l'anticorps de détection qui est le 2G12 (1µg/ml). Aucun signal positif n'est détecté même pour la protéine 133-
15 native. Ce résultat confirme des résultats obtenus en RIPA et en ELISA par l'équipe de D. Brand (Tours) sur l'enveloppe 133. Parren, en 1998, a décrit un isolat primaire résistant aux trois anticorps neutralisant 2G12, 2F5 et B12. Ses résultats indiquent que cette résistance
20 est probablement due à un changement global de la structure oligomérique de l'enveloppe.

Reconnaissance du site de fixation au CD4.

La glycoprotéine d'enveloppe a la capacité de
25 lier le CD4 avec une forte affinité. Cette capacité de liaison est primordiale dans le processus d'infection.

- Fixation du CD4 soluble (CD4s). Le format ELISA suivant a été utilisé :

- Coating D7324 (surnageant) ou 12G11B10 (lysat).
- 30 - Saturation.
- Lysat dilué au 1/10 ou surnageant au pur.
- CD4s (NIAID) dilué à 1µg/ml en PBS1x-Tween 0,1%-BSA 20 µg/ml ; incubation 2 heures à 22°C.
- Polyclonal anti-CD4 biotinylé dilué à 1µg/ml en
35 PBS1x-Tween 0,1%-BSA 20 µg/ml ; incubation 1 heure à 22°C.

- Streptavidine-peroxidase (Jackson) dilué au 1/10000 en PBS1x-Tween 0,1%-BSA 20 µg/ml ; incubation 30 minutes à 22°C.

- Révélation par un mélange de 20mg OPD (Pierce) et de 10ml de Color2 (bioMérieux).

- Lecture à 492nm.

La quantité de CD4s détectée varie de la même façon sur les lysats et sur les surnageants (figure 4). L'intensité du signal est fonction du nombre de sites déglycosylés exception faite pour les mutants g12 et g14 qui correspondent à des doubles mutations. Les clones correspondant à des protéines d'enveloppe dont l'antigénicité ou le taux de clivage sont réduits ont un signal bas (g122, g13, g113, g123 et g1123).

Reconnaissance de l'épitope IgG1b12.

Cet anticorps monoclonal humain est décrit comme ayant une importante activité neutralisante à la fois sur isolats primaires (clade A-D) et sur souches de laboratoire. L'épitope est discontinu et recouvre le site de fixation au CD4. La reconnaissance se fait préférentiellement sur les oligomères à la surface des cellules infectées ou des virus, au dépend des « débris » qui empêchent une réponse neutralisante efficace.

Aucun signal positif n'a été noté quels que soient les clones testés. Ceci est en accord avec les résultats préliminaires de D. Brand sur l'enveloppe 133. IgG1b12 est décrit comme étant très sensible aux substitutions au niveau des boucles V1 et V2. Certains acides aminés dans les régions C2 et C3 sont aussi décrits comme jouant un rôle crucial dans la reconnaissance de l'épitope b12 (18). Une des particularités de l'enveloppe 133 est d'avoir une séquence protéique atypique comparée aux autres protéines d'enveloppe du même sous-type.

Reconnaissance de l'épitope F105 (cf. figure 5).

L'anticorps monoclonal humain F105 se lie à proximité du site de fixation au CD4. Le CD4s peut inhiber sa fixation. L'anticorps F105 neutralise les souches TCLA. Certains auteurs ont décrit une neutralisation pour quelques isolats primaires (19) mais les résultats sont très controversés.

La fixation de cet anticorps a été testée sur les lysats et les surnageants. Le format du test est le même que celui utilisé avec le 2G12. L'anticorps F105 (NIBSC) est utilisé à une concentration de 1µg/ml. Un signal important est noté pour le clone g12 (jusqu'à 4,5x le signal de la protéine native à quantité de protéine équivalente). La mutation n°294 présente sur g12 (mais non sur g2) est située au niveau de la boucle V3 ; on sait que l'attachement de F105 sur des glycoprotéines délétées pour V3 est amélioré. D'autres mutations semblent avoir un rôle crucial dans la reconnaissance de la protéine par l'anticorps. C'est le cas de la mutation n°255, présente dans les clones g13 et g113. Elle est localisée dans un peptide de la C2 décrit comme important dans l'échappement à la neutralisation par F105 (20). Il n'y pas de signal pour les mutants g1112 et ceux de la série g22/g122.

Reconnaissance des épitopes CD4 induits.

La fixation du CD4 induit des changements de conformation et permet la formation d'épitopes *de novo* dont l'émergence conditionne la fixation du co-récepteur.

- Reconnaissance de l'épitope CG10 (figure 6).

CG10 est un anticorps monoclonal murin capable de neutraliser certaines souches TCLA. Il se lie à proximité du « bridging-sheet » en compétition avec le 17b. Sa fixation est strictement dépendante du CD4 (21).

L'ELISA utilisé a le format suivant:

Coating: D7324 (surnageants) ou 12G11B10 (lysats).

Saturation.

Lysats dilués au 1/10 ou surnageants au pur.

Ajout (ou non ajout) de CD4s à 1µg/ml dilué en PBS1x-Tween 0,1%-BSA 20µg/ml ; incubation 2 heures à 22°C.

5 CG10 (don de Francisco Veas , UMR 5087, Montpellier) à 1µg/ml dilué en PBS1x-Tween 0,1%-BSA 20µg/ml ; incubation 1 heure à 22°C.

Conjugué anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Jackson) dilué au 1/5000 en PBS1x-Tween 0,1%-
10 BSA 20µg/ml

Révélation : 20mg OPD (Pierce) et de 10ml de Color2 (bioMérieux).

Lecture à 492nm.

Les résultats en ELISA montrent une bonne
15 reconnaissance de l'épitope CG10 en présence de CD4s et pour la majorité des protéines d'enveloppe à l'exception des mutants g122, g13, g113, g123 et g1123. Le signal corrèle bien avec le taux de fixation au CD4s (cf. figure 5). L'utilisation de CG10 seul conduit à une absence de
20 signal.

- Reconnaissance de l'épitope 17b (cf. figure 7).
17b est un anticorps monoclonal humain dirigé contre un épitope CD4-induit. Il a une activité neutralisante limitée à la fois pour les isolats primaires et les
25 souches TCLA. Si l'exposition de l'épitope ne dépend pas strictement de la fixation du CD4 elle est néanmoins améliorée par sa présence. Le format d'ELISA utilisé est le même que pour CG10. L'anticorps 17b est utilisé à la concentration de 1µg/ml. La détection se fait avec un
30 anticorps anti-Fc IgG humain couplé à la peroxydase et dilué au 1/5000 (Jackson). Dans l'expérience, on observe que certains mutants ont une bonne reconnaissance de cet anticorps et notamment les mutants g12/g112, g3 et g4/g14. Pour g12, le signal est environ 3x supérieur à celui
35 enregistré pour la protéine native à quantité de protéine équivalente. Les mutations présentes dans g12/g112

concernent la boucle V3 et le début de la région C3. Selon Wyatt (11) V2 et V3 couvriraient partiellement l'épitope 17b et c'est la fixation du CD4 qui permettrait un retrait de la boucle V2. On peut imaginer que la déglycosylation de la boucle V3 (NB: la boucle V3 de la séquence 133 a un seul site potentiel de glycosylation) et des sites situés à sa base permettent à la fois un démasquage partiel de la boucle V3 et une augmentation de sa flexibilité qui pourraient en conséquence conduire à une meilleure accessibilité de l'épitope 17b.

Les expériences détaillées ci-dessus montrent l'intérêt des mutants g12, g112 et g14 au regard de leurs caractéristiques antigéniques et fonctionnelles .

L'immunogénicité des mutants g12 et g112 (bonne affinité pour F105 et pour 17b) doit être bonne. Les mutants de la série g4/g14 sont intéressants car ils ont une bonne réactivité vis à vis des différents anticorps testés.

Exemple 4 : sélection d'un panel de mutants et évaluation du pouvoir neutralisant des anticorps générés après immunisation de souris Balb/C

D'après les résultats d'ELISA, le panel de mutants suivant : g12, g112, g14 a été choisi. Le mutant g13 a aussi été évalué du fait du positionnement en cluster des sites mutés sur la face « silencieuse » du domaine externe de la gp120. Le mutant g123 (mutant non-cluster), ainsi que le gène de l'enveloppe sauvage, ont été utilisés comme références.

Chaque gène d'enveloppe a été sous-cloné dans un vecteur pCi-Rev qui dérive du vecteur pCi-Néo (Promega) par remplacement du gène de la *néomycine* par le gène *rev* qui se trouve alors sous la dépendance du promoteur SV40. Chaque construction a été préparée avec un Kit d'extraction de plasmide endotoxine-free (Macherey-Nagel PC2000 EF).

Les immunisations ont été effectuées de la façon suivante : pour chaque construction 5 souris Balb/C femelles ont été immunisées par biolistique (GeneGun, Biorad) à l'aide de particules d'or préalablement recouvertes de 4 µg de plasmide à injecter. Cinq injections successives ont eu lieu à J0, J14, J28, J54 et J68. A J40 et J80 des échantillons de sang sont prélevés dans l'œil des animaux. Ces échantillons ont servi à tester la montée des anticorps dirigés contre l'enveloppe après les différentes immunisations. Pour ce faire, des ELISA ont été effectués : de la protéine d'enveloppe gp160 (ABL) diluée à 1µg/ml été adsorbée sur des plaques 96 puits (Nunc). Après saturation des sites non spécifiques, les sérums des souris immunisées aux jours J0, J40 et J80 sont utilisés à des dilutions allant de 1/100 à 1/800, puis révélés par un anticorps dirigé contre les anticorps de souris couplé à la peroxidase de raifort (Jackson). Une DO lue supérieure à 0,35 est considérée comme significative. Le tableau 5 ci-dessous récapitule les souris positives obtenues pour chaque construction.

Tableau 5

constructions	souris "positives" en ELISA
pCI-Rev-g12	S3, S4
pCI-Rev-g112	S1, S2
pCI-Rev-g13	S5
pCI-Rev-g14	S3, S4
pCI-Rev-g123	S2, S4, S5
pCI-Rev-env sauvage	S1, S2, S3, S4

Les sérums de ces souris ont été utilisés dans deux tests de neutralisation décrits ci-après :

a- Le virus FR (virus primaire X4) a été mis en contact avec des dilutions sériées (au 1/10^{ième}, 1/20^{ième} et

1/40^{ième}) des différents sérums de souris pendant 1h à 37°C dans du milieu DMEM (Euromedex) puis rajouté dans des plaques 96 puits où ont été préalablement mises en culture des cellules Hela P4PCCR5. Ces cellules possèdent le récepteur CD4 et les co-récepteurs CCR5 et CXCR4. Elles ont le gène de la B-galactosidase, sous la dépendance d'un LTR rétroviral. Après 1h de co-culture, 200µl de milieu DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal sont rajoutés. Les cellules sont alors incubées 48h à 37°C. A l'issue de ces 24h, l'expression de la B-galactosidase est révélée grâce à une solution d'X-gal à 400µg/ml en potassium ferricyanide 0,2M/potassium ferrocyanide 0,2M/MgCl₂ 2M. Le pourcentage de neutralisation correspond au pourcentage de cellules non infectées, pour lesquelles la synthèse de B-Galactosidase n'a pas été induite. Des essais ont été effectués en parallèle avec du virus mais sans sérum de souris (contrôle d'infection) ou avec du sérum de souris non immunisées (contrôle du bruit de fond de la neutralisation, Tneg). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6 ci-dessous et la figure 8.

TABLEAU 6

TnegS1	30	30	30
TnegS2	30	30	30
g12-S3	75	65	40
g12-S4	70	30	30
g13-S5	30,5	30	30
g14-S3	70	50	30
g14-S4	75	50	30
g112-S1	30,2	30	30
g112-S2	29,7	30	30
g123-S3	30,5	30	30
g123-S4	31,5	30	30
g123-S5	31	30	30
wt-S1	30,7	30	30
wt-S2	30,5	30	29,7

15

20

25

30

35

40

On observe que pour la majorité des sérums, il n'y a pas de réponse neutralisante se différenciant du bruit de fond (environ 30% de neutralisation). Cependant, pour les constructions pCI-rev-g12 et pCI-rev-g14, les
5 souris positives en ELISA (respectivement S3/S4 et S3/S4) donnent une réponse neutralisante significative à la dilution 1/10 (70% de neutralisation). Ce pourcentage est moindre pour une dilution au 1/20 et rejoint la valeur du bruit de fond pour une dilution au 1/40, excepté pour la
10 souris S3 immunisée par pCI-rev-g12 dont la valeur est légèrement supérieure (40%). Les sérums des souris immunisées par les constructions non mutées (Pci-rev-env sauvage = wt) et positifs en ELISA ne sont pas neutralisants dans ce format de test.

15

b- Les sérums de souris ont été évalués pour leur capacité à neutraliser l'infection de cellules permissives par des pseudo-particules portant l'enveloppe 133 sauvage (= autologue non mutée). Les sérums des souris positives
20 ainsi que 2 sérums de souris non immunisées ont été incubés pendant 1h à 37°C en dilutions sériées (de 1/8 à 1/128) avec les surnageants de culture contenant les pseudo-particules. Les pseudo-particules portant l'enveloppe 133 sauvage ont été obtenues de la façon
25 suivante : Des cellules 293T ont été co-transfectées par la construction pCI-env133 et par le plasmide pNL4-3luc (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) avec un rapport pNL4-3luc/pCI-env133 de 1/3. Cette transfection est réalisée grâce au kit Calcium Phosphate Transfection
30 System (Gibco). Le plasmide pNL4-3luc permet d'exprimer tous les gènes viraux sauf *vpr* et *env* (saut de trame) ainsi que le gène de la Luciférase. Par complémentation, des pseudo-particules virales portant les enveloppes recombinantes 133 sauvage sont formées. Quarante-huit
35 heures après transfection, les surnageants de culture sont récupérés et centrifugés afin d'éliminer les débris

cellulaires. Ils sont ensuite complétés à 20% de sérum de veau fœtal, aliquotés et stockés à -80°C . Un dosage de la p24, réalisé sur l'automate VIDAS (bioMérieux), permet d'évaluer la quantité de particules virales présente dans ces surnageants.

L'infection de cellules GHOST-CCR5 ou GHOST-CXCR4 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program ; ces cellules expriment le CD4) est effectuée sur la nuit, en plaques de culture de 96 puits, par contact avec un volume de surnageant contenant les pseudoparticules préalablement mises en contact avec les sérums (10ng d'équivalent p24 par puit). Du milieu de culture est ensuite rajouté. Après 3 jours supplémentaires d'incubation, les surnageants sont éliminés, les cellules sont rincées avec du PBS 1X. La lyse et la réaction enzymatique sont effectuées avec le kit LucLite Plus (Perkin Elmer) ; la lecture de la luminescence est réalisée sur un lecteur de plaques TopCount (Packard Biosciences).

Les résultats montrent que pour les sérums g12-S3, g14-S3 et g14-S4, on observe une légère neutralisation pour une dilution au 1/8 puisque, pour ces échantillons, la luminescence est environ 23% moins importante que celle enregistrée pour les sérums de souris avant immunisation ($V_{g19-S3} = 85\ 000$ contre $V_{T0} = 111\ 000$). Ces résultats semblent aller dans le même sens que ceux décrits dans l'expérience précédente. L'exception vient du sérum g12-S4 pour lequel aucune activité neutralisante n'est constatée.

Exemple 5 : évaluation de la fonctionnalité de tous les mutants de déglycosylation : infection par des pseudo-virus et essais de neutralisation de cette infection par des sérums humains HIV-1 positifs.

L'obtention de pseudoparticules exprimant les différents mutants de déglycosylation est importante car elle permet d'étudier la protéine d'enveloppe dans son

contexte naturel c'est à dire intégrée dans une particule virale.

Des cellules 293T ont été co-transfectées par chacune des constructions pCI-env mutées (mutants de
5 déglycosylation, cf. liste sur tableau 2) et par le plasmide pNL4-3luc (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) suivant le protocole décrit dans l'exemple 1 ci-dessus.

Quarante-huit heures après transfection, les
10 surnageants de culture sont récupérés et centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires. Ils sont ensuite complétés à 20% de sérum de veau fœtal, aliquotés et stockés à -80°C. Un dosage de la p24, réalisé sur l'automate VIDAS (bioMérieux), permet d'évaluer la
15 quantité de particules virales présentes dans ces surnageants.

L'infection de cellules GHOST-CCR5 ou -CXCR4 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) est effectuée sur la nuit, en plaques de culture de 24 puits, par
20 contact avec un volume de surnageant correspondant à 50ng de p24 par puit. Le milieu de culture est alors renouvelé. Après 3 jours supplémentaires d'incubation, les surnageants sont éliminés, les cellules sont rincées avec du PBS 1X et lysées par 300µl de CCLR (Cell Culture Lysis
25 Reagent de Promega) pendant 15 minutes. Un volume de 20µl de ces lysats est mis en contact avec 80µl de substrat (Luciferase Assay System de Promega) et la mesure de la luminescence est réalisée sur un luminomètre (Turner Designs TD 20/20). Les résultats sont regroupés dans la
30 figure 9.

Cette expérience indique que plus le nombre de mutations est important, plus la capacité des enveloppes recombinantes à induire l'infection des GHOST-CCR5 diminue. Elle est nulle pour les constructions qui sont
35 peu ou pas clivées. Aucun mutant n'induit l'infection des cellules GHOST-CXCR4. Ces résultats sont en accord avec

les tests de formation de syncytia précédemment décrits (cf. tableau 4). Cependant aucune infection n'est détectée pour les mutants g112, g122, g13 et g123, alors qu'une légère activité de fusion cellule à cellule était observée. Pour le mutant g14, utilisé dans les expériences de neutralisation, un faible taux d'infection est observé. Afin de compléter cette étude, nous avons contrôlé la présence de la protéine d'enveloppe dans les virions. Pour cela, nous avons concentré et purifié les pseudo-particules par ultracentrifugation sur un coussin de saccharose 20% pendant 3h à 70000g. Les culots ont été lysés en PBS-Triton 0.5% et un dosage de la p24 a permis de normaliser les échantillons. Un Western-Blot a alors été réalisé en utilisant un anticorps polyclonal anti-gp120 (Biogenesis). Env est détectée uniquement dans les pseudo-particules qui infectent les cellules GHOST : lorsqu'on augmente le nombre de sites déglycosylés, l'exportation de la protéine d'enveloppe à la membrane plasmique ainsi que l'incorporation de l'enveloppe dans les pseudo-particules semble être affectée.

Enfin, la sensibilité de ces pseudo-particules vis-à-vis de sérums neutralisants a été évaluée : avant l'infection de cellules indicatrices GHOST-CCR5, les surnageants de culture contenant les pseudo-particules sont incubés pendant 1h à 37°C en présence de dilutions sériées de sérum humain. Il s'agit du sérum GRI/LY (don du Dr C. Moog, INSERM U544, Strasbourg) dont le titre neutralisant a été déterminé pour 5 isolats primaires de différents sous-types. En parallèle, les sérums HIV-1 neutralisants de référence #1 et #2 (NIBSC) ont été utilisés en contrôle sur les pseudo-particules portant l'enveloppe 133 native. Le protocole d'infection est similaire à celui décrit plus haut. L'infection est réalisée en plaques 96 puits par contact avec un volume équivalent à 10ng de p24. La lyse et la réaction enzymatique sont effectuées avec le kit LucLite Plus

(Perkin Elmer). La lecture de la luminescence est réalisée sur un lecteur de plaques TopCount (Packard Biosciences).

Les résultats sont illustrés dans la figure 10.

La courbe « sérum négatif » correspond à une
5 expérience menée sur des pseudo-virions exprimant l'enveloppe sauvage mis en présence d'un sérum HIV-1 négatif (CTS Lyon-Gerland). C'est la courbe déterminant le bruit de fond. La neutralisation est effective pour une dilution de sérum supérieure à 1/640^{ème}.

10 Ces résultats montrent que les pseudo-particules sont neutralisées différemment suivant l'enveloppe exprimée à leur surface. Cependant, seuls les mutants g30 et g22 voient leur pourcentage d'infection significativement réduit par rapport à l'enveloppe sauvage
15 (non mutée). Même si il n'y a pas de corrélation directe entre cette expérience et la capacité d'un tel mutant à induire des anticorps neutralisants in vivo, le mutant g22 pourrait être un candidat intéressant à tester pour sa capacité à induire des anticorps neutralisants après
20 immunisation ADN de petits animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Moore, JP et Ho, DD, AIDS (1995), 9 suppl. A, pS117-S136
- 5 2. Trkola, A et al., Nature (1996) 384 (6605), p184-187
3. Girard, M et al., J. Virol. (1995) 69(10) p6239-6248
4. Poignard, P et al., Immunity (1999) 10(4) p431-438
5. McInerney, TL et al., J. Virol. (1998) 72(2) p1523-1533
6. Reitter, JN, Means RE et Desrosiers RC, Nat. Med (1998)
- 10 4(6) p679-684
7. Lee, WR et al., PNAS (1992) 89 p2213-2217
8. Ly A. et Stamatatos L, J. Virol. (1998) 74 p6769-6776
9. Kwong, PD, et al., Nature (1998) 393 (6686) p648-659
10. Zhu, X et al., Biochem (2000) 39 p11194-11204
- 15 11. Wyatt, R et al., Nature (1998) 393 (6686) p705-711
12. Kwong, PD et al., Structure (2000) 8 p1329-1339
13. Ataman-Önal, Y et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses (1999) 15(11) p1035-1039
14. Trkolla, A et al., J. Virol. (1996) 69 p6609-6617
- 20 15. Moullard, M et Decrollly, E, BBA (2000) 1469 p121-132
16. Pollakis, P et al., J. Bio. Chem. (2001) 276 p13433-13441
17. Buchacher, A et al., AIDS Res. & Hum. Ret. (1994) 10 p359-369
- 25 18. Moore, JP et al., J. Virol. (1995) 69 p101-109
19. Posner, M et al., J. AIDS (1993) 6 p7-14
20. Thali, M et al., J. Virol. (1992) 66 p5635-5641
21. Gershoni, JM et al., FASEB J. (1993) 7 p1185-1187
22. Wain-Hobson, L et al., Cell (1985) 40 p9-17
- 30 23. Ratner, L et al., Nature (1985) 313 p277-284
24. Muesing, MA et al., Nature (1985) 313 p450-458
25. Sanchez-Pescador et al., Science (1985) 227 p484-492.

REVENDICATIONS

1. Gène *env* muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, caractérisé en ce que ledit gène présente par rapport au gène *env* d'un isolat
5 primaire de primo-infection, dit de référence, au moins deux mutations au niveau des sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire à un autre, chaque mutation consistant en le remplacement d'un codon AAC ou AAT qui code pour une asparagine par un codon CAG ou CAA qui code
10 pour une glutamine, les deux mutations au moins étant choisies parmi les suivantes :

(a) au moins deux mutations dans la partie du gène *env* codant pour la région C3 de la protéine *env*,

(b) au moins une mutation dans la partie codant
15 pour la région C3 et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3,

(c) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C2 et au moins une mutation dans la partie codant pour la région V3 choisie parmi les sites de
20 glycosylation au niveau des codons 862-864 et 970-972,

(d) au moins une mutation dans la partie codant pour la région C2 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau des codons 667-669, 679-681, 700-702, 763-765, 844-846, et au moins une mutation dans la partie codant
25 pour la région V3,

la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides,

ou le gène *env* muté consiste en l'une quelconque des séquences SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10
30 ou leurs séquences complémentaires,

2. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce que selon les mutations (a), au moins une mutation est effectuée au niveau des codons 976-978, 991-993 de la partie codant pour la région C3 et au moins une mutation
35 est effectuée au niveau des codons 1039-1041 ou 1060-1062 de la partie codant pour la région C3, la position d'au

moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

3. Gène selon la revendication 2, caractérisé en ce que sa séquence consiste en une séquence choisie parmi
5 les séquences identifiées en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 et SEQ ID NO:23 ou leurs séquences complémentaires.

4. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce que selon les mutations (b), au moins une mutation est effectuée au niveau des codons 976-978, 991-993, 1039-1041
10 ou 1060-1062 de la partie codant pour la région C3 et au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 880-882 de la partie codant pour la région V3, la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

15 5. Gène selon la revendication 4, caractérisé en ce que les mutations sont effectuées au niveau des codons 976-978, 991-993 et 880-882, la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

20 6. Gène selon la revendication 5, caractérisé en ce que sa séquence consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 et SEQ ID NO:4 ou leurs séquences complémentaires.

7. Gène selon la revendication 4, caractérisé en
25 ce que, au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 976-978 ou 991-993, au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 880-882, et au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 1039-1041 ou 1060-1062, la position d'au moins l'un quelconque desdits
30 codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

8. Gène selon la revendication 7, caractérisée en ce que les mutations sont effectuées au niveau des codons 976-978, 991-993, 880-882, 1039-1041 et 1060-1062.

9. Gène selon la revendication 8, caractérisé en
35 ce que sa séquence consiste en une séquence choisie parmi

les séquences identifiées en SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 et SEQ ID NO : 7 ou leurs séquences complémentaires.

10. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce que selon les mutations (c), au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 805-807 de la partie codant pour la région C2, la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

11. Gène selon la revendication 1, caractérisé en ce que selon les mutations (d), au moins une mutation est effectuée au niveau du codon 880-882 de la partie codant pour la région V3, la position d'au moins l'un quelconque desdits codons pouvant varier de trois à vingt-quatre nucléotides.

12. Glycoprotéine Env mutée du virus VIH-1, caractérisée en ce qu'elle présente par rapport à une protéine Env native d'un isolat primaire de primo-infection, dit de référence, au moins deux mutations au niveau des sites de glycosylation conservés de ladite protéine de référence, d'un isolat primaire à un autre, chaque mutation consistant en le remplacement d'une asparagine par une glutamine, les deux mutations au moins étant choisies parmi les suivantes :

(a') au moins deux mutations dans la région C3 de la protéine Env,

(b') au moins une mutation dans la région C3 et au moins une mutation dans la région V3,

(c') au moins une mutation dans la région C2 et au moins une mutation dans la région V3 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau de l'acide aminé 288 ou 324,

(d') au moins une mutation dans la région C2 choisie parmi les sites de glycosylation au niveau de l'un quelconque des acides aminés 223, 227, 234, 255, 282, et au moins une mutation dans la région V3,

la position desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés,

ou la glycoprotéine Env mutée consiste en l'une
5 quelconque des séquences ou le gène env muté consiste en l'une quelconque des séquences SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20.

13. Glycoprotéine selon la revendication 12, caractérisée en ce que selon les mutations (a'), au moins
10 une mutation est effectuée au site de glycosylation au niveau de l'acide aminé 326 ou 331 et au moins une mutation est effectuée au site de glycosylation au niveau de l'acide aminé 347 ou 354,

la position desdits sites de glycosylation
15 conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés.

14. Glycoprotéine selon la revendication 13, caractérisée en ce que sa séquence consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID
20 NO: 21, SEQ ID NO: 22 et SEQ ID NO: 23.

15. Glycoprotéine selon la revendication 12, caractérisée en ce que selon les mutations (b'), au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 326 ou 331 et au moins une mutation est effectuée au niveau de
25 l'acide aminé 294,

la position d'au moins l'un quelconque desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre, pouvant varier d'un à huit acides aminés.

30 16. Glycoprotéine selon la revendication 15, caractérisée en ce que les mutations sont effectuées au niveau des acides aminés 326, 331 et 294,

la position d'au moins l'un quelconque desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de
35 primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés.

17. Glycoprotéine selon la revendication 16, caractérisée en ce que sa séquence consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 et SEQ ID NO: 14.

5 18. Glycoprotéine selon la revendication 12, caractérisée en ce, selon les mutations (b'), au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 326 ou 331, au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 347 ou 354 et au moins une mutation est
10 effectuée au niveau de l'acide aminé 294,

la position d'au moins l'un quelconque desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés.

15 19. Glycoprotéine selon la revendication 18, caractérisée en ce que les mutations sont effectuées au niveau des acides aminés 326, 331, 294, 347 et 354,

la position d'au moins l'un quelconque desdits sites de glycosylation conservés d'un isolat primaire de
20 primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés.

20. Glycoprotéine selon la revendication 19, caractérisée en ce que sa séquence consiste en une séquence choisie parmi les séquences identifiées en SEQ ID
25 NO: 15, SEQ ID NO: 16 et SEQ ID NO: 17.

21. Glycoprotéine selon la revendication 12, caractérisée en ce que, selon les mutations (c'), au moins une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 269 de la région C2, la position desdits sites de
30 glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés.

22. Glycoprotéine selon la revendication 12, caractérisée en ce que, selon les mutations (d'), au moins
35 une mutation est effectuée au niveau de l'acide aminé 294 de la région V3, la position desdits sites de

glycosylation conservés d'un isolat primaire de primo-infection à un autre pouvant varier d'un à huit acides aminés.

23. Composition pharmaceutique comprenant :

5 (i) au moins un gène muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, ledit gène muté étant choisi parmi l'un quelconque des gènes décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 11 et étant placé sous le contrôle de séquences de régulation
10 permettant son expression dans une cellule hôte,
un véhicule pharmaceutiquement acceptable,
et

de manière facultative un agent additionnel qui facilite la pénétration dudit gène muté dans ladite
15 cellule et/ou qui permet de cibler ladite cellule ; ou

(ii) au moins le gène identifié en (i) cloné dans un vecteur viral recombinant.

24. Composition pharmaceutique comprenant :

-au moins une glycoprotéine d'enveloppe mutée du
20 virus VIH-1, ladite glycoprotéine mutée étant choisie parmi l'une quelconque des glycoprotéines décrites dans l'une quelconque des revendications 12 à 22,

-un véhicule et/ou excipient et/ou adjuvant et/ou diluant pharmaceutiquement acceptable.

25 25. Procédé pour obtenir des anticorps selon lequel on immunise un animal mammifère, tel que souris ou rat ou singe, avec au moins un gène muté codant pour une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, ledit gène muté étant choisi parmi l'un quelconque des gènes décrits
30 dans l'une quelconque des revendications 1 à 11 et étant placé sous le contrôle de séquences de régulation permettant son expression *in vivo*.

26. Procédé pour obtenir des anticorps selon lequel on immunise un animal mammifère, tel que souris ou
35 rat ou singe, avec au moins une glycoprotéine d'enveloppe mutée du virus VIH-1, ladite glycoprotéine mutée étant

choisie parmi l'une quelconque des glycoprotéines décrite dans l'une quelconque des revendications 12 à 22.

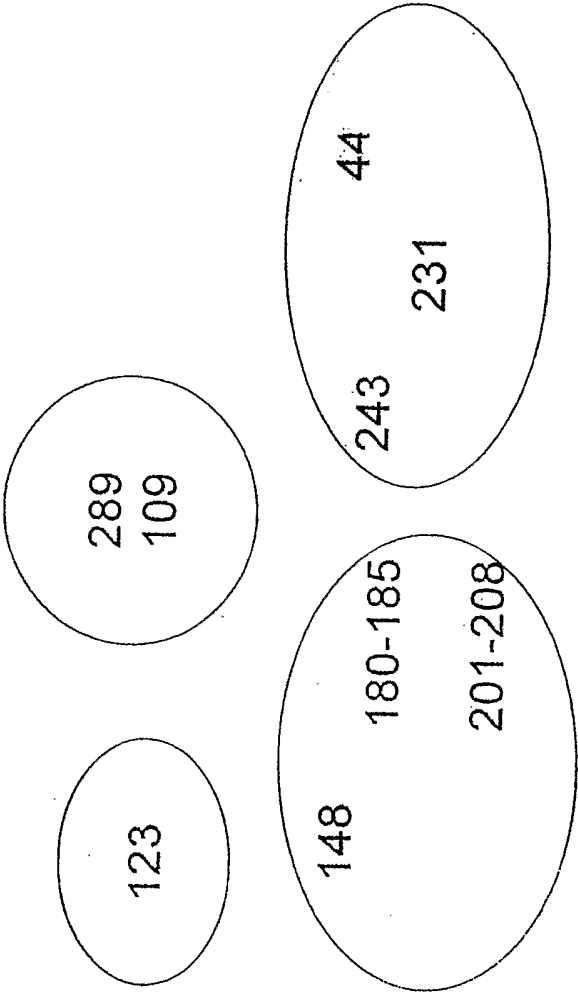
27. Anticorps obtenus selon le procédé de la revendication 25 ou 26.

5 28. Composition pharmaceutique comprenant au moins un anticorps selon la revendication 27.

29. Procédé d'évaluation d'un agent thérapeutique, selon lequel on administre à un animal au moins un gène muté codant pour une glycoprotéine
10 d'enveloppe mutée du virus VIH-1 tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 11, et on réalise :

- un dosage d'anticorps spécifiques de la glycoprotéine mutée, et/ou
- un dosage des anticorps neutralisants
15 spécifiques de la glycoprotéine mutée ou native, et/ou
- un dosage de la réponse immune cellulaire induite contre la glycoprotéine mutée par exemple par un test d'activation in vitro de cellules lymphocytes T « helper » spécifique(s) de la glycoprotéine mutée.

FIG1



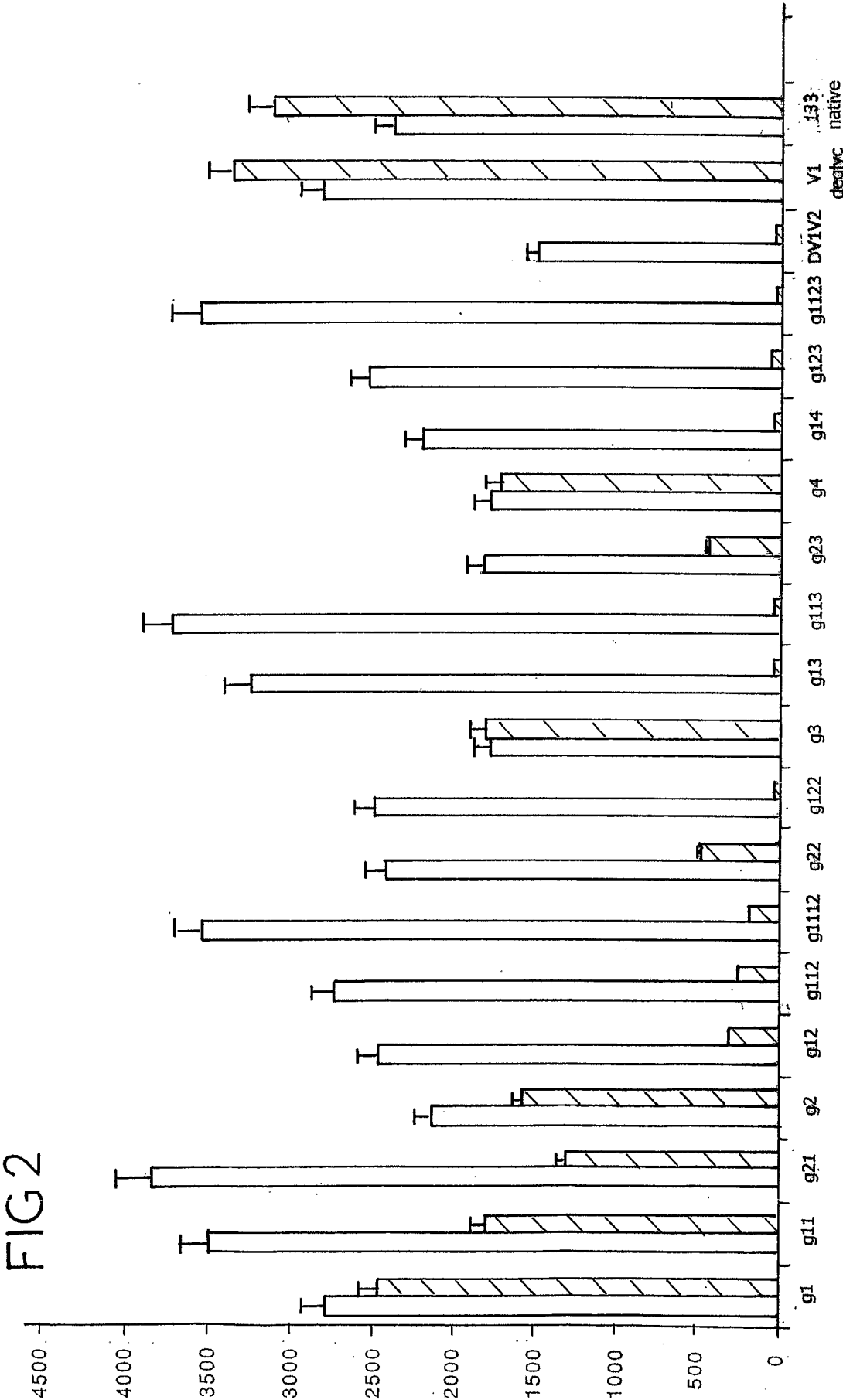


FIG 3a

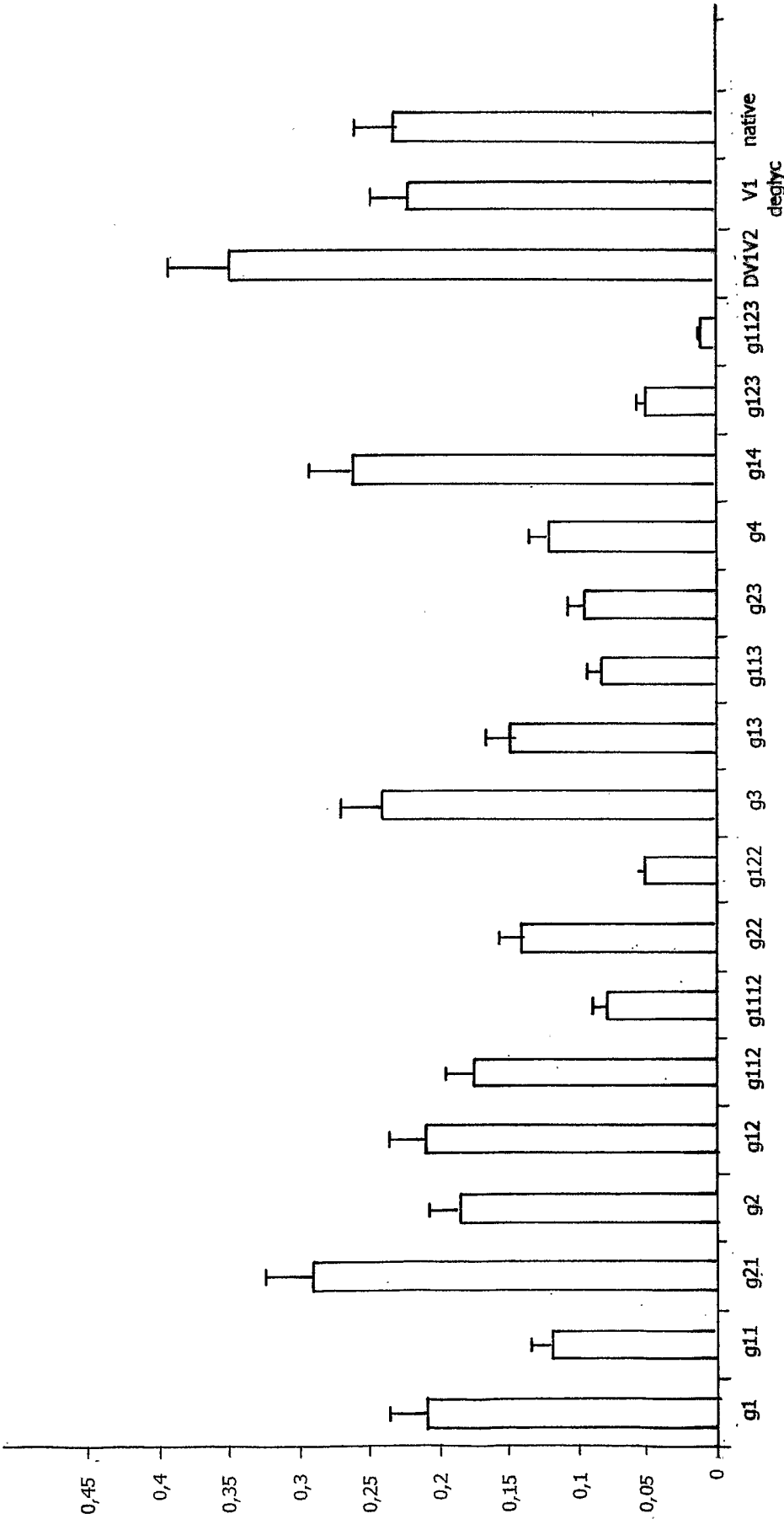


FIG3b

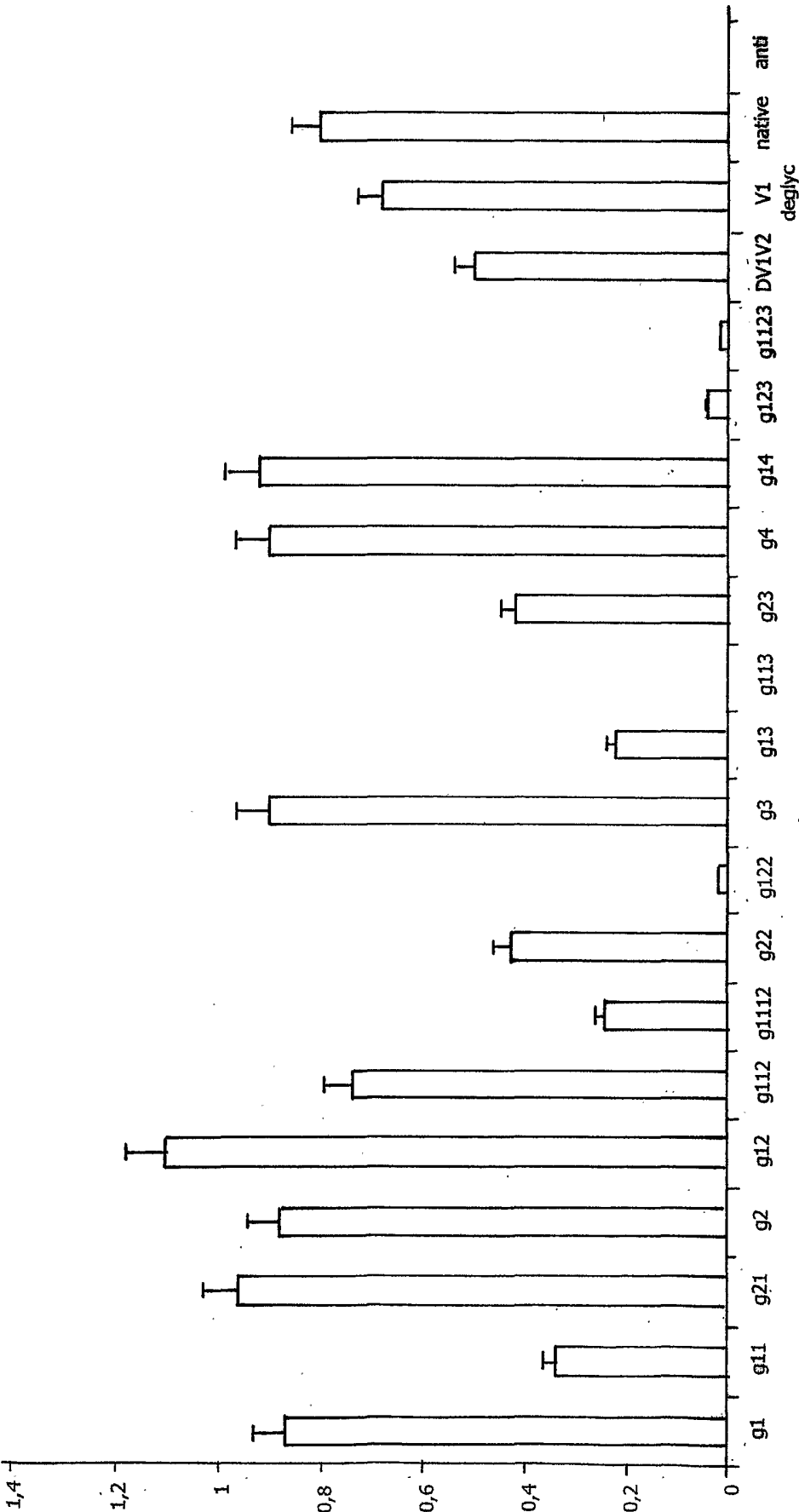


FIG4a

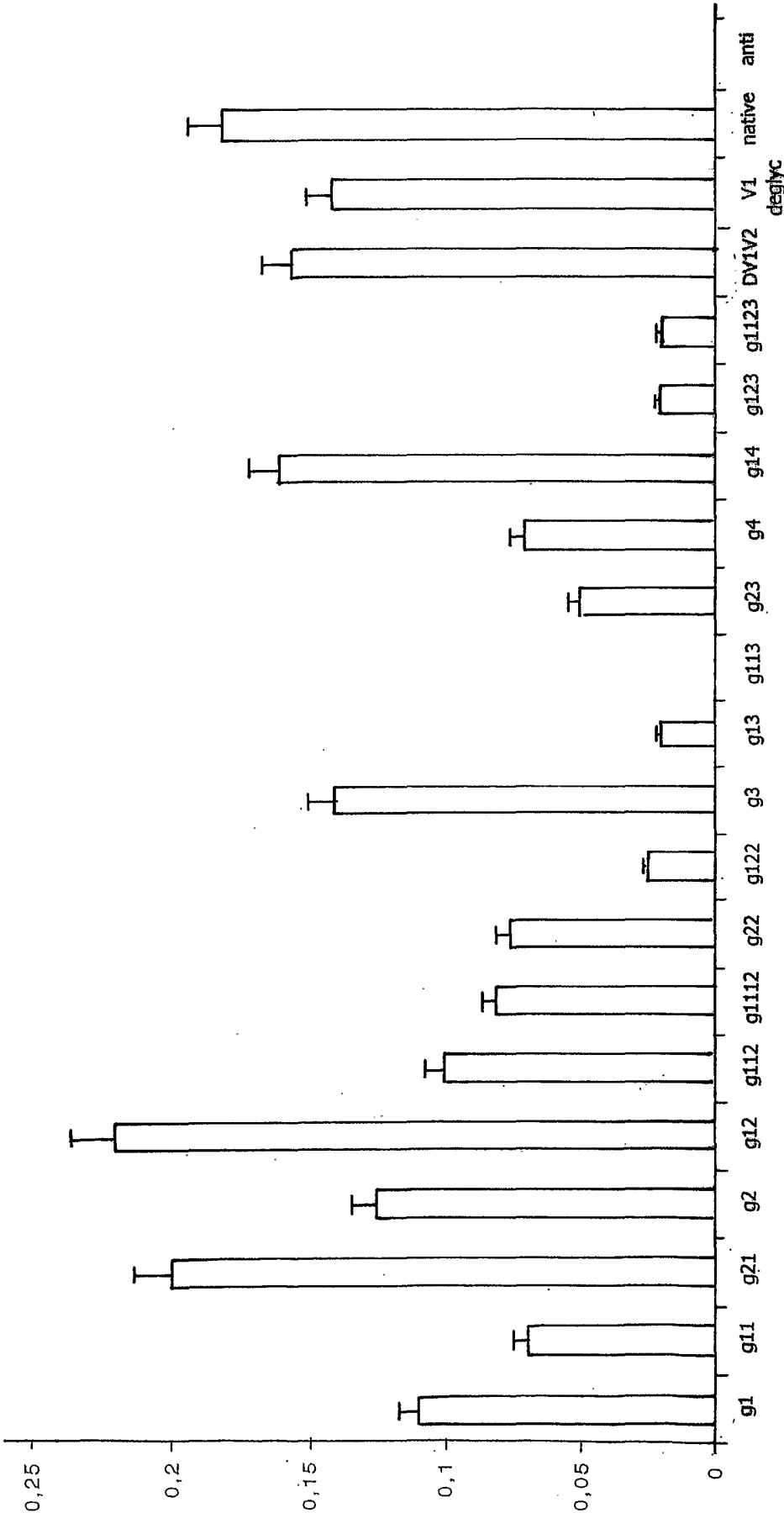


FIG4b

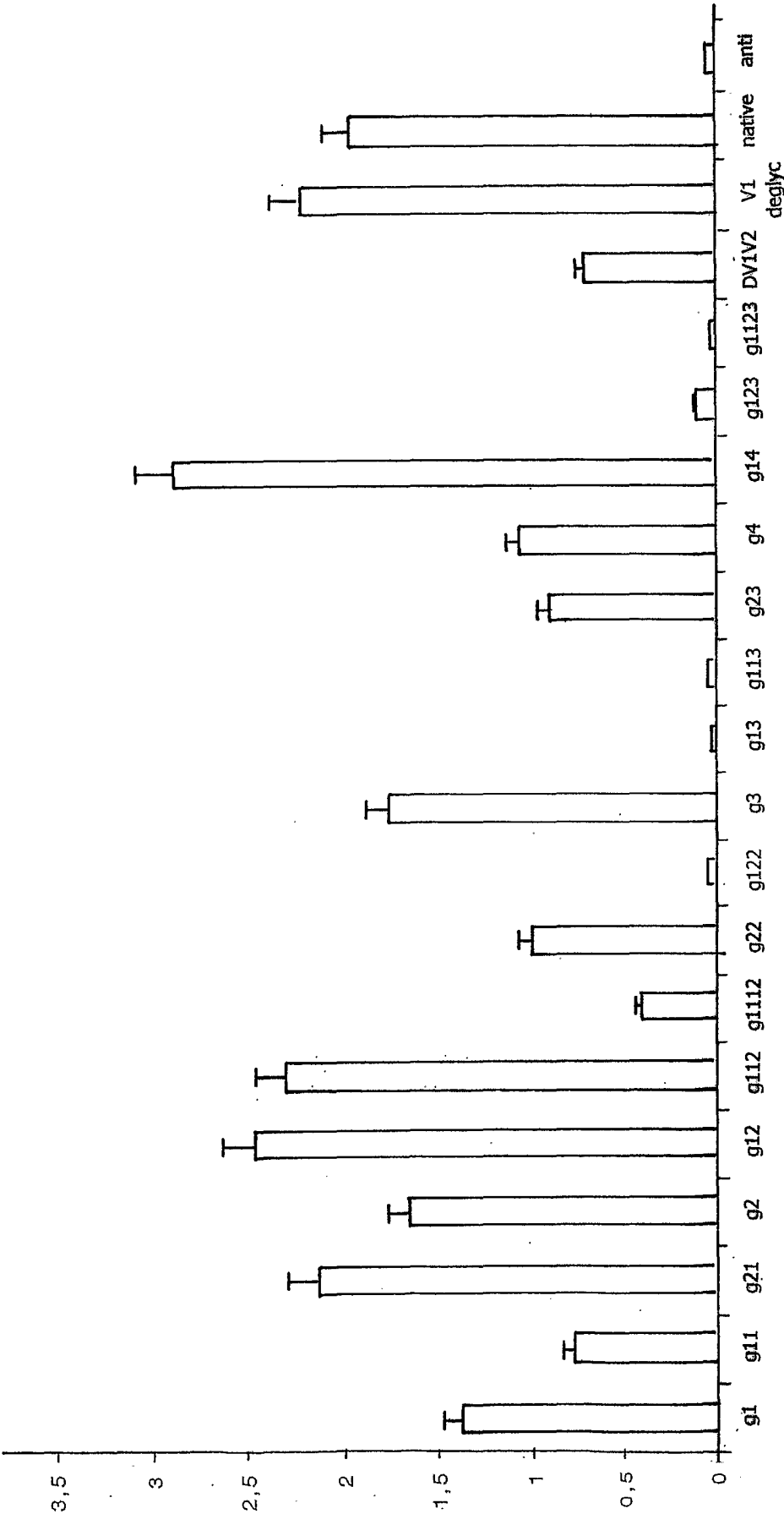


FIG 5a

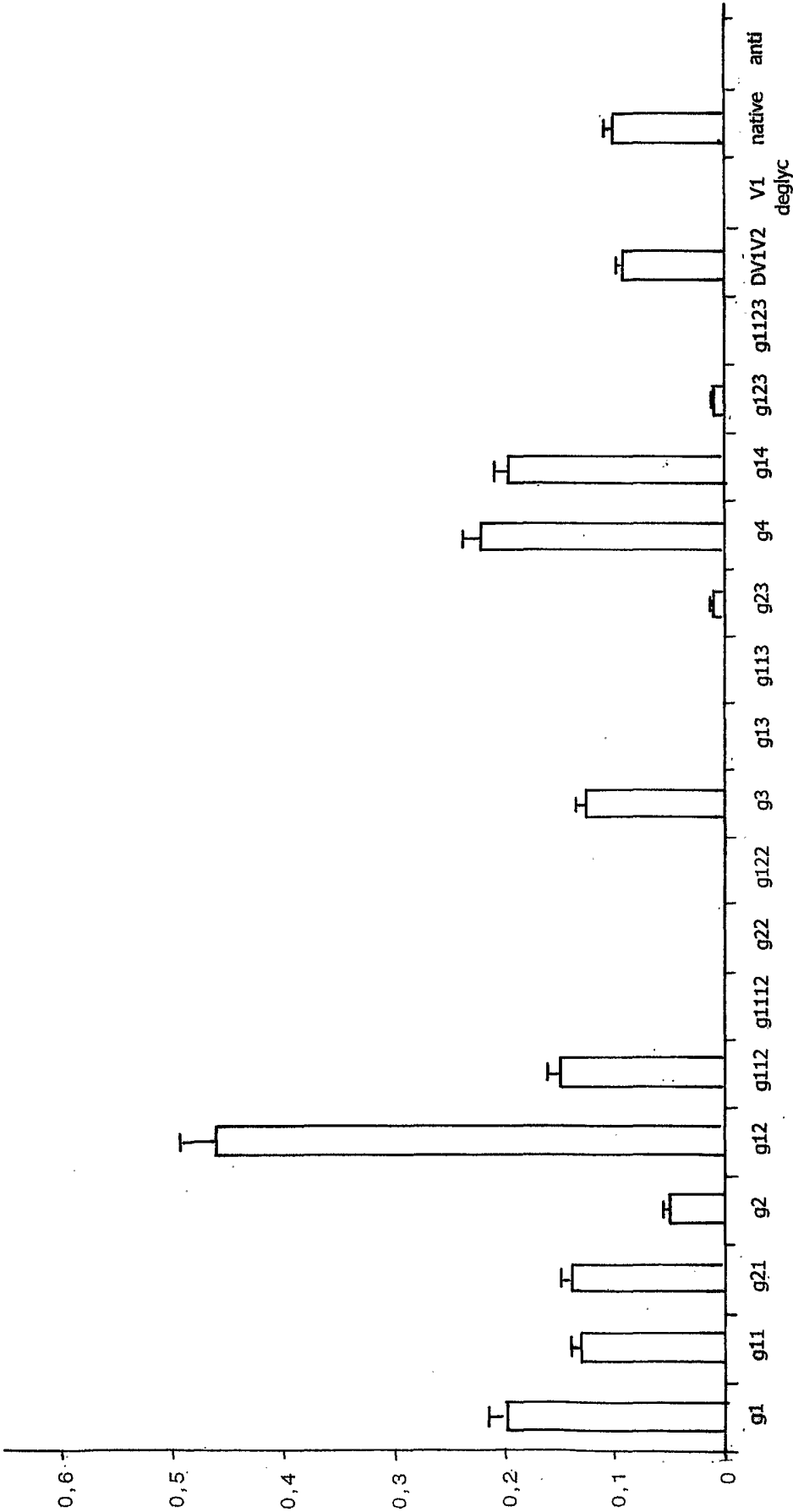


FIG 5b

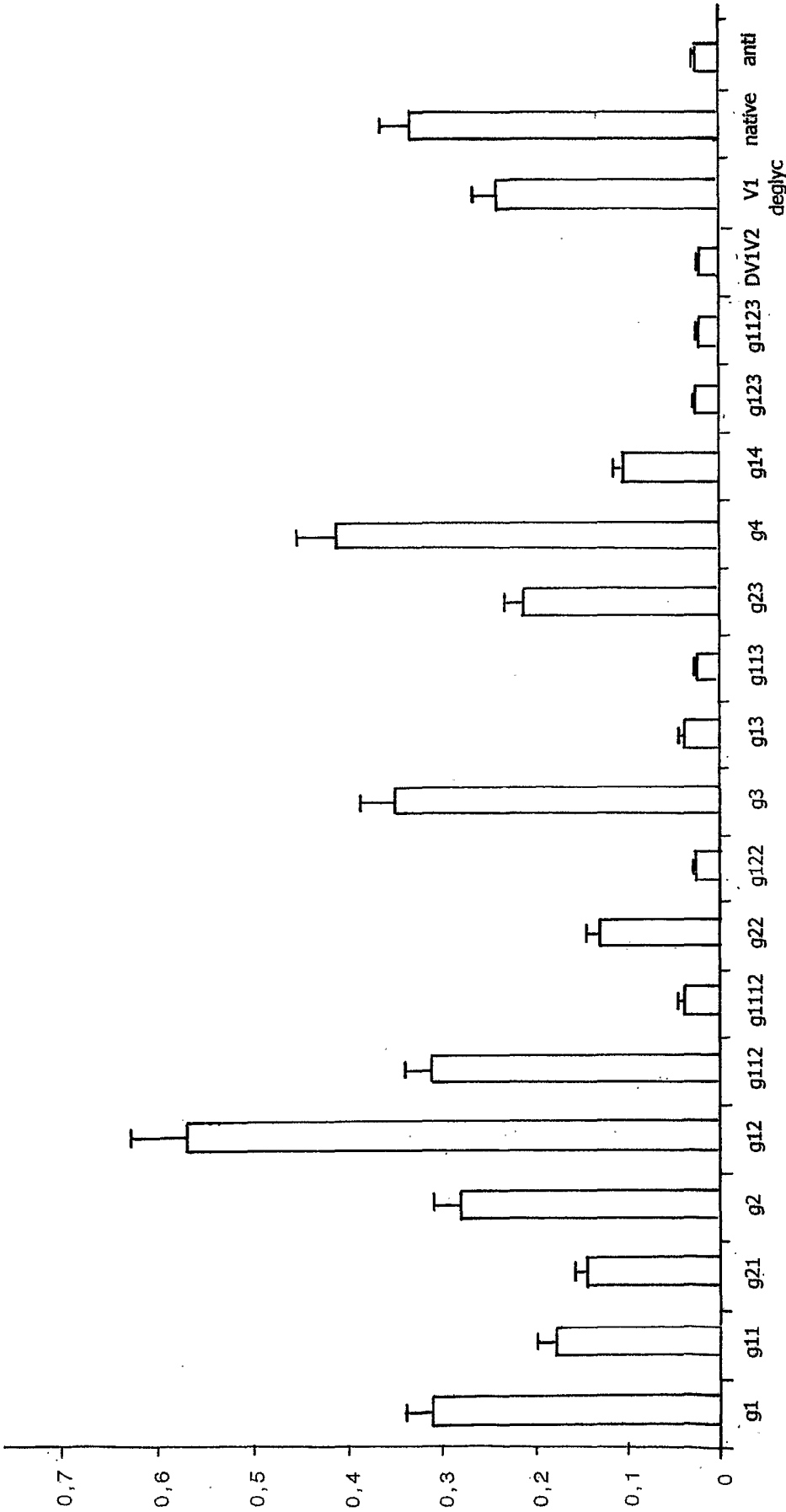


FIG 6a

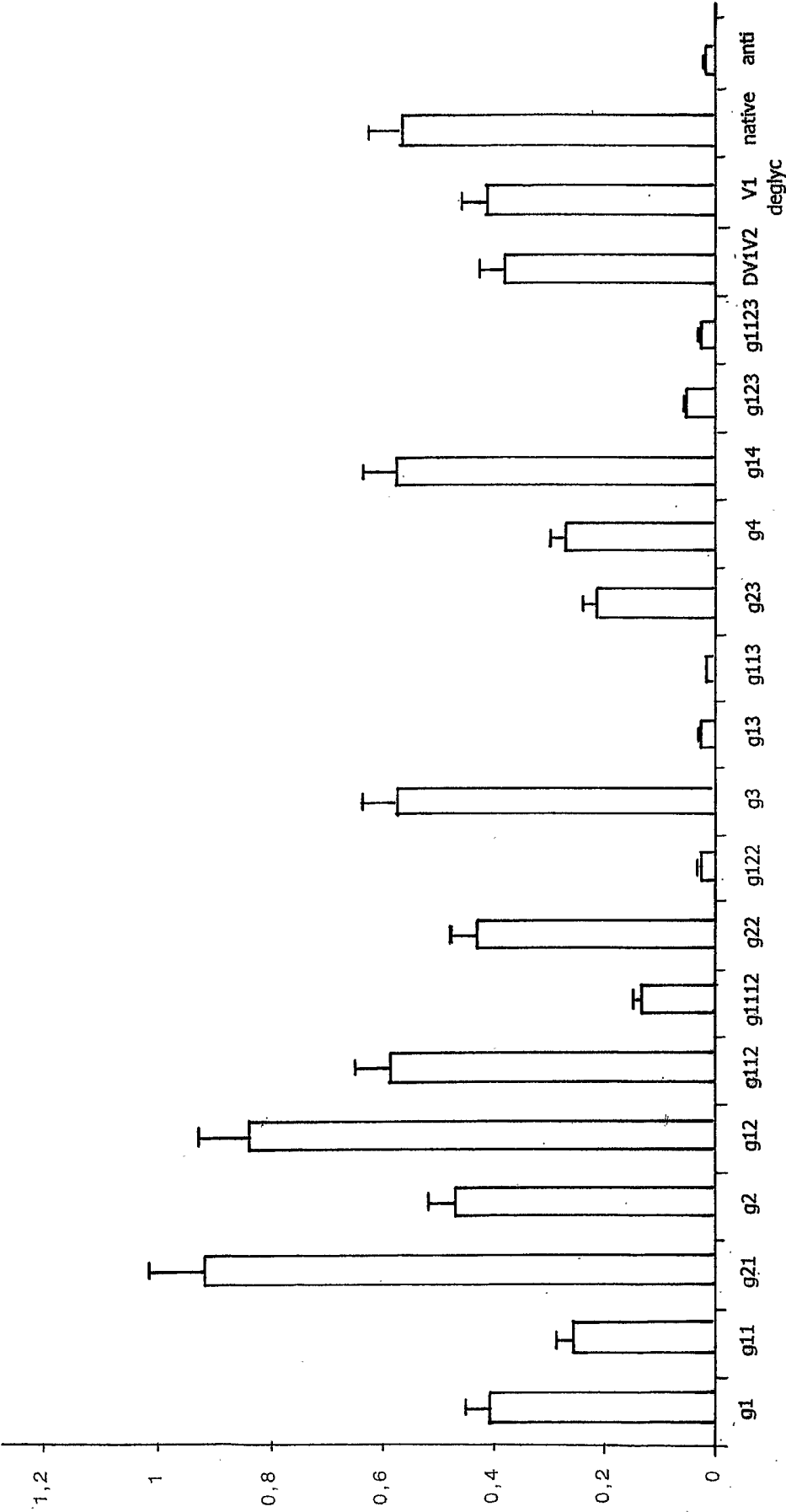


FIG 6b

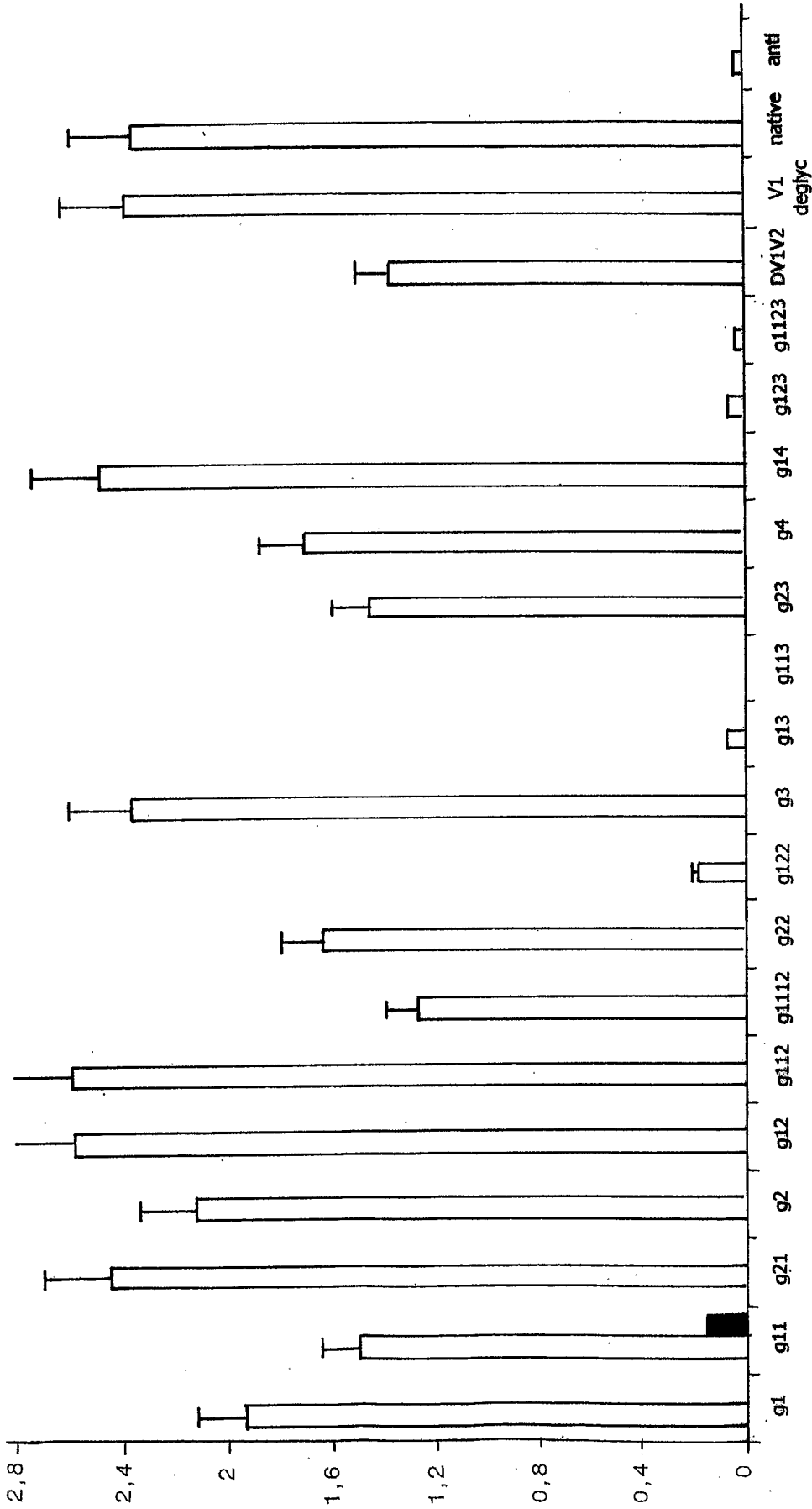


FIG 7a

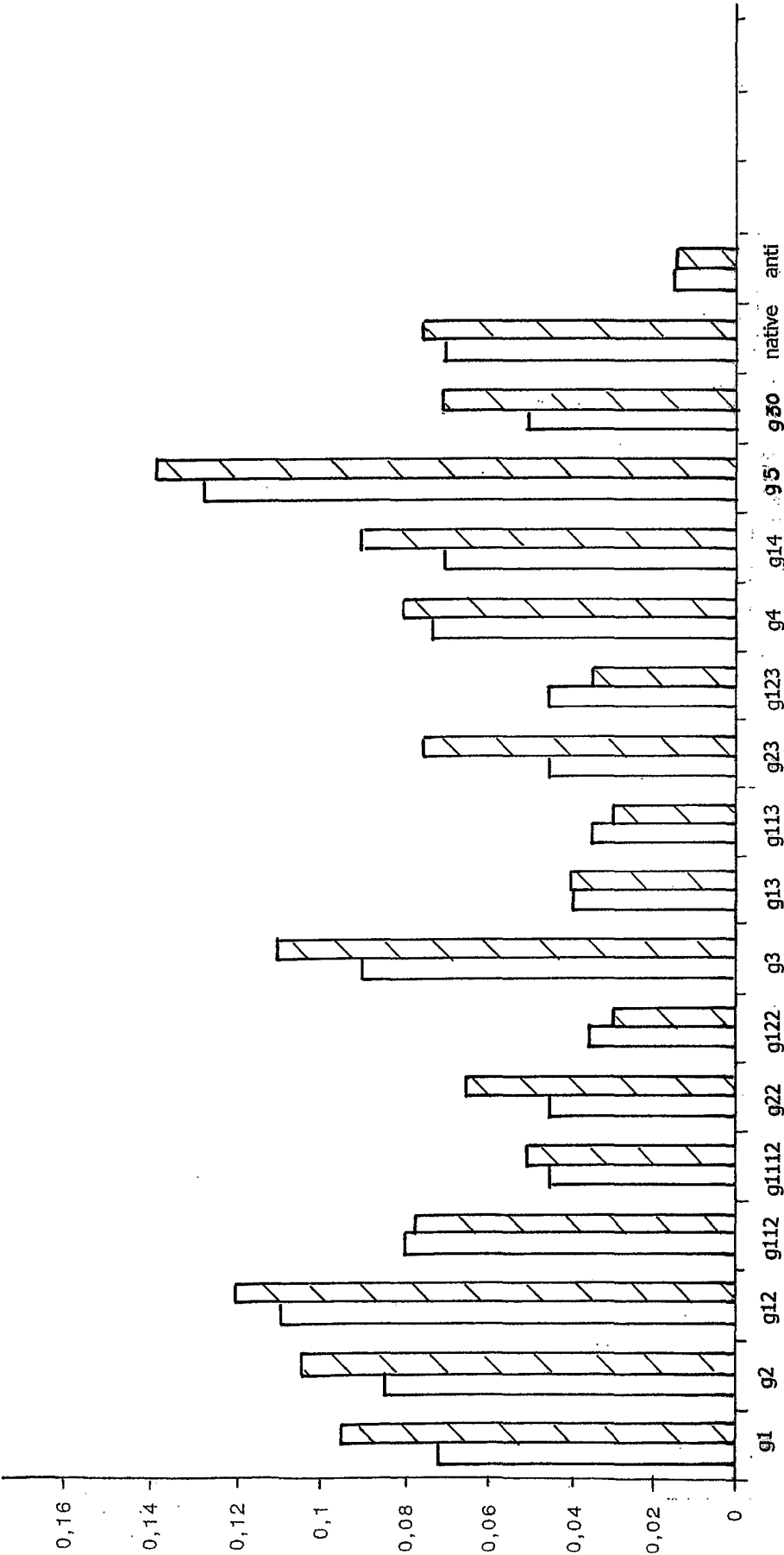


FIG 7b

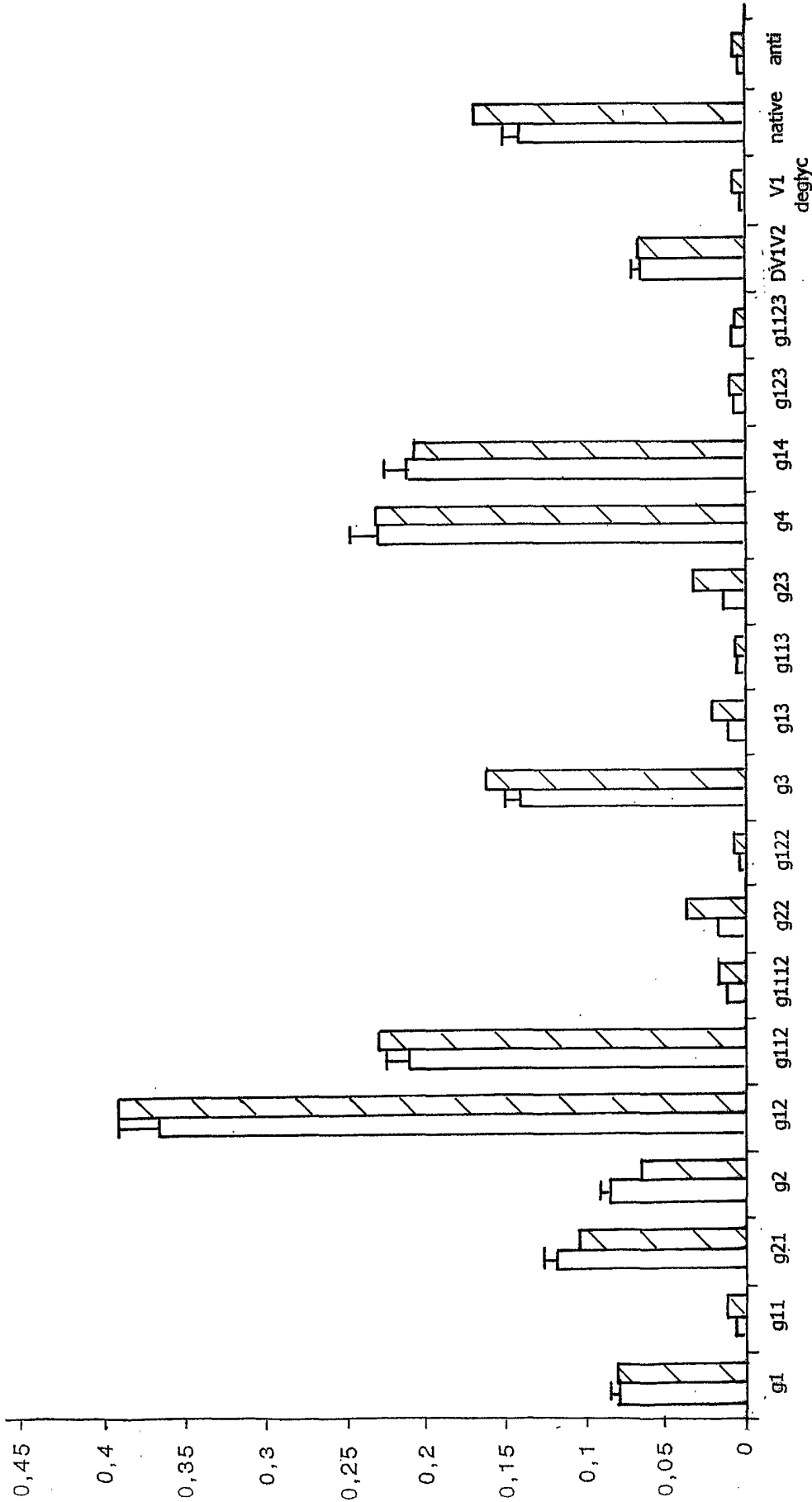


FIG 8

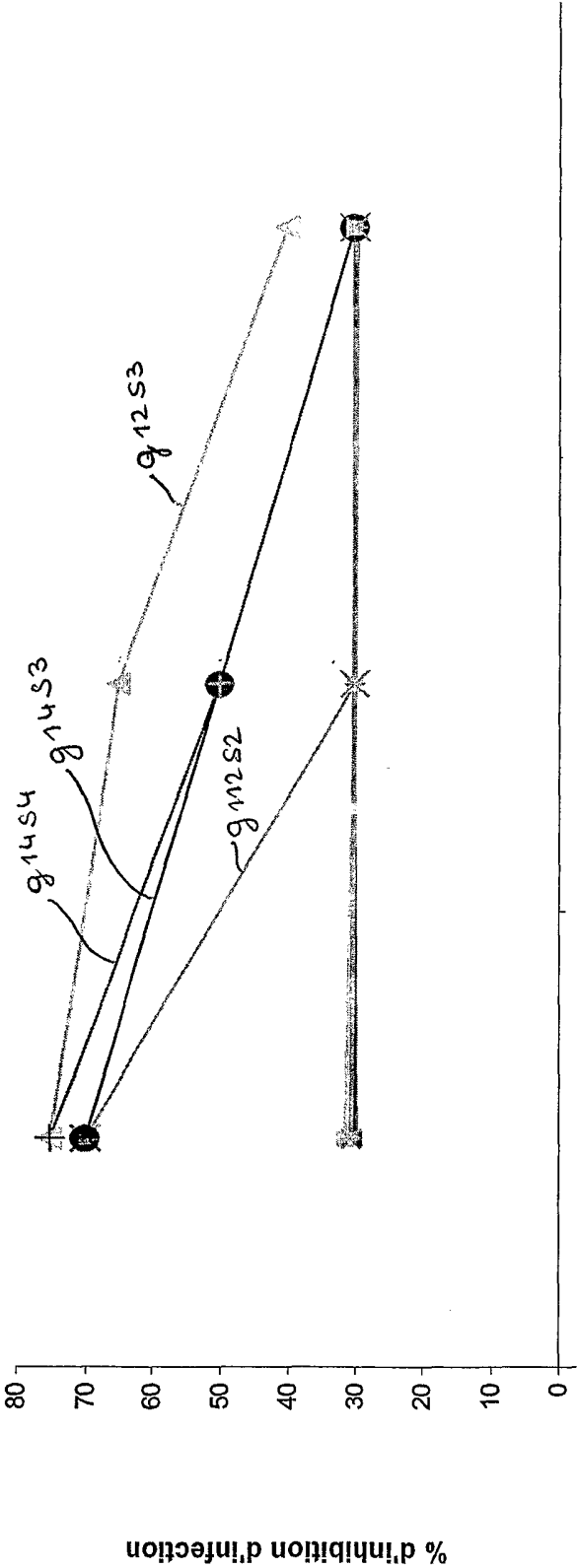


FIG 9

Infection par des pseudo-particules portant les enveloppes déglycosylées

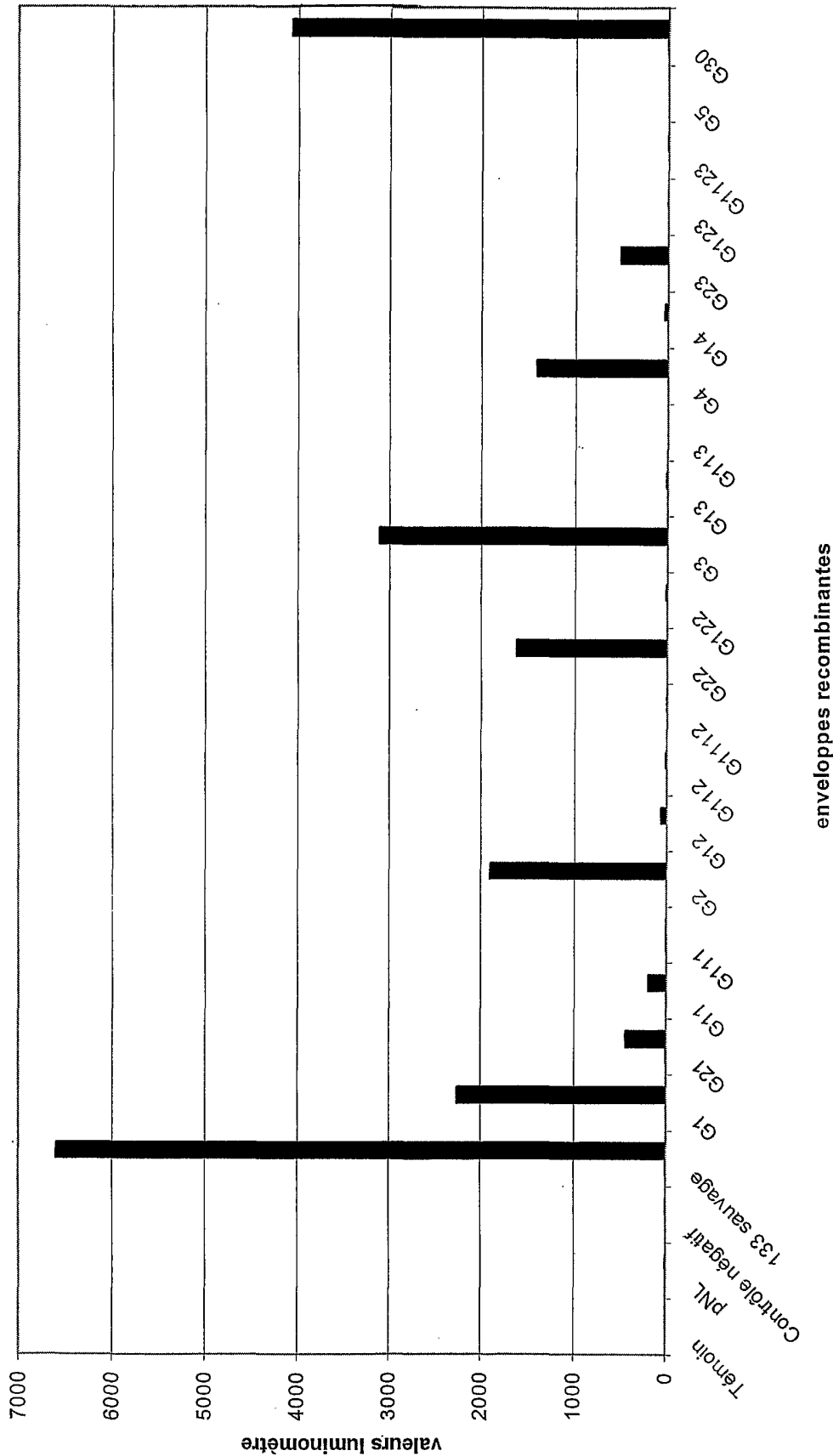
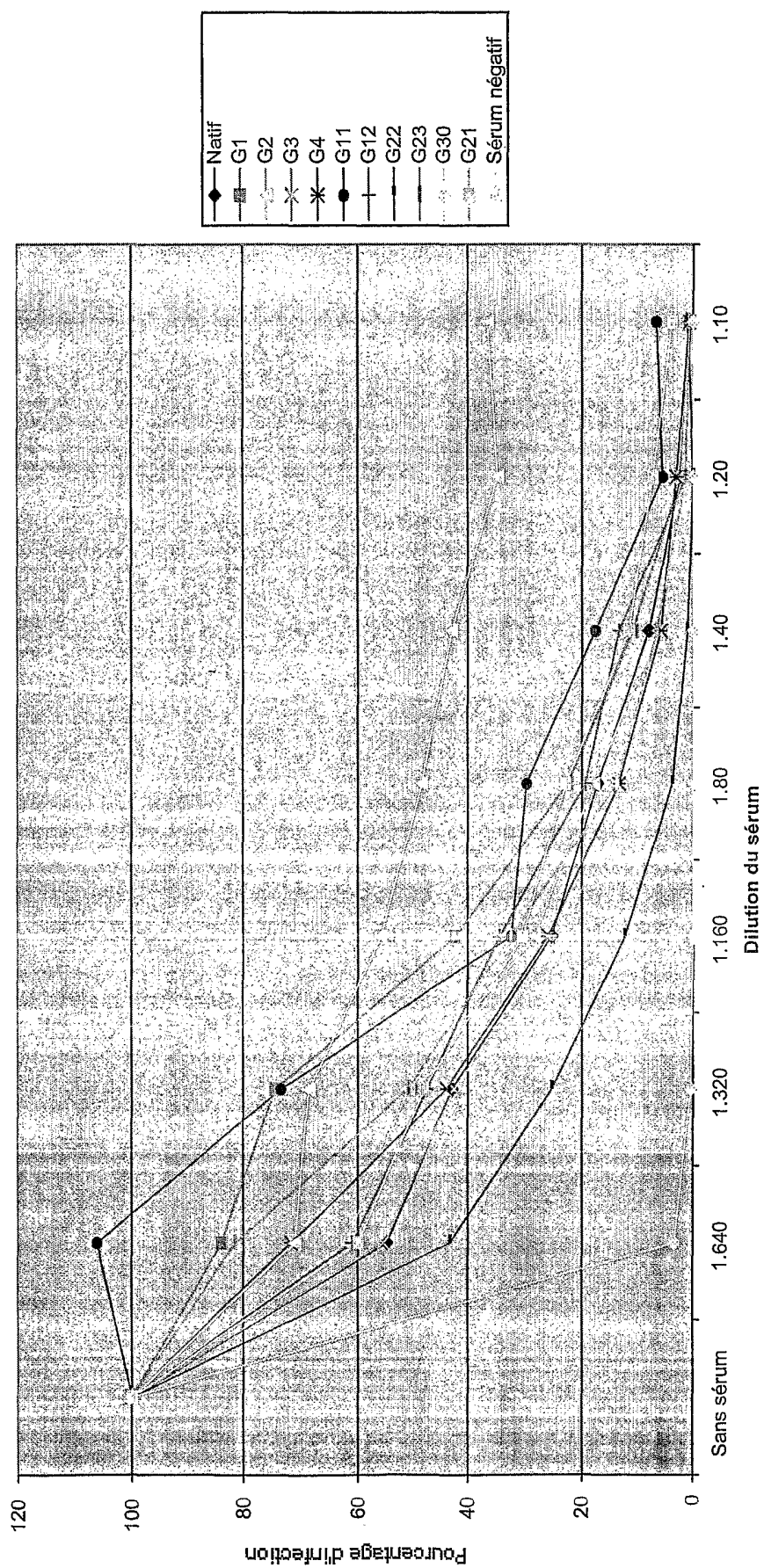


FIG 10

Neutralisation des pseudo-particules par le sérum GRV/LI



LISTE DE SEQUENCES

<110> bioMérieux

<120> GENE ENV du VIH-1 MUTE, GLYCOPROTEINE ENV MUTÉE ET
UTILISATIONS

<130> HIV1-m

<140>

<141>

<150> FR0111699

<151> 2001-09-06

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2535

<212> ADN

<213> VIH-1 133

<400> 1

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctggggccaca catgcctgtg taccacacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtca ttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agacccaaca acaacacaag agaagtata 900
catataggac caggggagcgc attttataca acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattaatgg aacacaatgg aataaaactt taagtctaag agttgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaataa taaaacaata atcttttaga actcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380

```

```

gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggg acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaagggt acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
tttgacataa caaactggct gtggtatata aaaatattca taatgatagt aggaggcttg 2040
ataggtttta gaatagtttt tactgtactt tctatagtga atagagttag gcagggatac 2100
tcaccattat cgttggagac ccgcctccca acccagaggg gacccgacag gcccgagga 2160
atcgaagaag aagggtggaga gagagacaga gacacatccg gtcaattagt gaatggattc 2220
ttagcaatta tctgggtcga cctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca ccgcttgaga 2280
gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg gtgggaagcc 2340
ctcaagtatt tgtggaatct cctccagtat tggagtcagg aactaaagaa gagtgtgttt 2400
agcttgttca atgccatagc catagcagta gctgagggga cagataggat aatagaagta 2460
atacaaaggg cttatagggc cattctccac atacctagaa gaataagaca gggcttgga 2520
aggcttttgc tataa 2535

```

<210> 2

<211> 2535

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g12

<400> 2

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtc tttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaacc agaacacaag agaagtata 900
catataggac cagggagcgc attttatata acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtctaag agttgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaataa taaaacaata atcttttagga actcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200

```

```

acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggg acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggctat tgagggcgaa cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaagggt acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
tttgacataa caaactggct gtggtatata aaaatattca taatgatagt aggaggcttg 2040
ataggtttaa gaatagtttt tactgtactt tctatagtga atagagttag gcagggatac 2100
tcaccattat cgttggagac cgcctccca acccagaggg gacccgacag gcccgaggga 2160
atcgaagaag aaggtggaga gagagacaga gacacatccg gtcaattagt gaatggattc 2220
ttagcaatta tctgggtcga cctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca ccgcttgaga 2280
gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg gtgggaagcc 2340
ctcaagtatt tgtggaatct cctccagtat tggagtcagg aactaaagaa gagtgtgttt 2400
agcttgttca atgccatagc catagcagta gctgagggga cagataggat aatagaagta 2460
atacaaaggg cttatagggc cattctccac atacctagaa gaataagaca gggcttgtaa 2520
aggcttttgc tataa 2535

```

<210> 3

<211> 1494

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g12

<400> 3

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtca ttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaacc agaacacaag aagaagtata 900
catataggac cagggagcgc attttataca acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtctaag agttgataaa 1020

```

```

ttaaagaaac aatttaataa taaaacaata atcttttagga actcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cacgagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtgc agagagaaaa aaga 1494

```

<210> 4

<211> 2007

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g12

<400> 4

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgaac acctcagtca ttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaacc agaacacaag aagaagtata 900
catataggac caggagcgc attttatata acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtcta atgtgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaataa taaaacaata atcttttagga actcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cacgagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggt acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaaggt acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920

```

caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
 ttgacataa caaactggct gtggtat 2007

<210> 5

<211> 2535

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g112

<400> 5

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
 cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
 gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
 gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacacaga cccaaccca 240
 cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
 gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
 ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
 accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
 aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
 agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtca ttaccacagg ctgtccaaag 600
 gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
 tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
 acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
 acagaggtag taattagatc tgacaatttc tcgaacaatg ctaaaacat aatagtacaa 840
 ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaacc agaacacaag aagaagtata 900
 catataggac caggagcgc attttatata acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
 gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtctaat agttgataaa 1020
 taaagaaac aatttaataca gaaaacaata atctttaggc agtcctcagg aggggaccca 1080
 gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
 ctgtttaata gtatttggtat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
 aactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
 tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcacaa acattacagg gctgctatta 1320
 acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
 gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
 ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg 1500
 ggaatgctag gagccatggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
 gcgtcactgg cgttgacggt acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
 aacaatttgc tgagggctat tgagggcga cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
 atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaaggt acctagggga tcaacagctc 1740
 ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
 agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
 aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
 caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
 ttgacataa caaactggct gtggtatata aaaatatca taatgatagt aggaggcttg 2040
 ataggtttaa gaatagtttt tactgtactt tctatagtga atagagttag gcagggtatc 2100
 tcaccattat cgttgagac ccgcctccca acccagaggg gacccgacag gcccgaggga 2160
 atcgaagaag aaggtggaga gagagacaga gacacatccg gtcaattagt gaatggattc 2220
 ttagcaatta tctgggtcga cctgcgagc ctgtgcctct tcagctacca ccgcttgaga 2280

```

gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg gtgggaagcc 2340
ctcaagtatt tgtggaatct cctccagtat tggagtcagg aactaaagaa gagtgcgtgt 2400
agcttggttca atgccatagc catagcagta gctgagggga cagataggat aatagaagta 2460
atacaaaggg cttatagggc cattctccac atacctagaa gaataagaca gggcttggaa 2520
aggcttttgc tataa 2535

```

<210> 6

<211> 1494

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g112

<400> 6

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtc tttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tgaacaatg ctaaaacat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaacc agaacacaag agaagtata 900
catataggac caggagcgc attttatata acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtctaag agttgataaa 1020
ttaaagaac aatttaata gaaaacaata atctttaggc agtcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtg agagagaaaa aaga 1494

```

<210> 7

<211> 2007

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g112

<400> 7

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120

```

```

gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtc ttaccacagg ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgcccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tcgaacaatg ctaaaacat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaacc agaacacaag agaagtata 900
catataggac caggagcgc attttatata acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtctaag agttgataaa 1020
ttaagaaac aatttaata gaaaacaata atctttaggc agtcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatgtt cttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggc acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaaggc acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
tttgacataa caaactggct gtggtat 2007

```

<210> 8

<211> 2535

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g14

<400> 8

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cagcatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480

```

```

aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtc ttacccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctgggttttg gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgaccagttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agacccaacc agaacacaag aagaagtata 900
catataggac cagggagcgc attttataca acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattaatgg aacacaatgg aataaaactt taagtctaag agttgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaataa taaaacaata atcttttagga actcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttgat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagttag aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcacaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtgggtgtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggt acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaaggt acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
tttgacataa caaactggct gtggtatata aaaatattca taatgatagt aggaggcttg 2040
ataggtttaa gaatagtttt tactgtactt tctatagtga atagagttag gcagggatac 2100
tcaccattat cgttgagac ccgcctccca acccagaggg gaccgacag gcccgaggga 2160
atcgaagaag aaggtggaga gagagacaga gacacatccg gtcaattagt gaatggattc 2220
ttagcaatta tctgggtcga cctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca ccgcttgaga 2280
gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg gtgggaagcc 2340
ctcaagtatt tgtggaatct cctccagtat tggagtcagg aactaaagaa gagtgtgtt 2400
agcttgttca atgccatagc catagcagta gctgagggga cagataggat aatagaagta 2460
atacaaaggg cttatagggc cattctccac atacctagaa gaataagaca gggcttggaa 2520
aggcttttgc tataa 2535

```

<210> 9

<211> 1494

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g14

<400> 9

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300

```

```

gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtca ttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgaccagttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccacacc agaacacaag aagaagtata 900
catataggac caggagcgc attttataca acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattaatgg aacacaatgg aataaaactt taagtcta atgtgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaataa taaaacaata atcttttagga actcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttgat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcacaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtgc agagagaaaa aaga 1494

```

<210> 10

<211> 2007

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g14

<400> 10

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtca ttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgaccagttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccacacc agaacacaag aagaagtata 900
catataggac caggagcgc attttataca acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattaatgg aacacaatgg aataaaactt taagtcta atgtgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaataa taaaacaata atcttttagga actcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttgat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200

```

```

acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggttggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccacacaa ggcaaggaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggg acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaagggt acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
tttgacataa caaactggct gtggtat 2007

```

<210> 11

<211> 844

<212> PRT

<213> VIH-1 133

<400> 11

```

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

```

```

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
      20              25              30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
      85              90              95

```

```

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

```

```

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

```

```

Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
      130             135             140

```

Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175
 Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser
 180 185 190
 Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 195 200 205
 His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu
 210 215 220
 Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 225 230 235 240
 Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 245 250 255
 Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Ser Asn
 260 265 270
 Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn
 275 280 285
 Cys Ile Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro
 290 295 300
 Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 305 310 315 320
 Ala His Cys Asn Ile Asn Gly Thr Gln Trp Asn Lys Thr Leu Ser Leu
 325 330 335
 Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe
 340 345 350
 Arg Asn Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn
 355 360 365
 Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser
 370 375 380
 Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 405 410 415
 Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser
 420 425 430
 Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr
 435 440 445
 Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460
 Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480
 Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495
 Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 500 505 510
 Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln
 515 520 525
 Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu
 530 535 540
 Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly
 545 550 555 560
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly
 565 570 575
 Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 580 585 590
 Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys
 595 600 605
 Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp
 610 615 620
 Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln
 625 630 635 640
 Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 645 650 655

Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
 660 665 670

Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Thr
 675 680 685

Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser
 690 695 700

Leu Glu Thr Arg Leu Pro Thr Gln Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly
 705 710 715 720

Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Thr Ser Gly Gln Leu
 725 730 735

Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Val Asp Leu Arg Ser Leu Cys
 740 745 750

Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg
 755 760 765

Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Leu
 770 775 780

Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Lys Ser Ala Val
 785 790 795 800

Ser Leu Phe Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg
 805 810 815

Ile Ile Glu Val Ile Gln Arg Ala Tyr Arg Ala Ile Leu His Ile Pro
 820 825 830

Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Leu Leu Leu
 835 840

<210> 12

<211> 844

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g12

<400> 12

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln

14

275		280		285
Cys Ile Arg Pro Asn Gln Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro				
290		295		300
Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln				
305		310		315 320
Ala His Cys Asn Ile Gln Gly Thr Gln Trp Gln Lys Thr Leu Ser Leu				
	325		330	335
Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe				
	340		345	350
Arg Asn Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn				
	355		360	365
Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser				
	370		375	380
Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile				
385		390		395 400
Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val				
	405		410	415
Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser				
	420		425	430
Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr				
	435		440	445
Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp				
	450		455	460
Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro				
465		470		475 480
Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu				
	485		490	495
Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly				
	500		505	510
Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln				
	515		520	525
Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu				

530	535	540	
Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly			
545	550	555	560
Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly			
	565	570	575
Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys			
	580	585	590
Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys			
	595	600	605
Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp			
	610	615	620
Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln			
	625	630	635
Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser			
	645	650	655
Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile			
	660	665	670
Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Thr			
	675	680	685
Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser			
	690	695	700
Leu Glu Thr Arg Leu Pro Thr Gln Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly			
	705	710	715
Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Thr Ser Gly Gln Leu			
	725	730	735
Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Val Asp Leu Arg Ser Leu Cys			
	740	745	750
Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg			
	755	760	765
Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Leu			
	770	775	780
Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Lys Ser Ala Val			

```
<210> 13
<211> 498
<212> PRT
<213> VIH-1 mutant q12
```

17

Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asp	Val	Val	Pro	165	170	175	
Ile	Asp	Asn	Ser	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Leu	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Ser	180	185	190	
Val	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ile	Pro	Ile	195	200	205	
His	Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Asn	Glu	210	215	220	
Thr	Phe	Asp	Gly	Lys	Gly	Pro	Cys	Thr	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	225	230	235	240
Thr	His	Gly	Ile	Arg	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	245	250	255	
Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Asp	Asn	Phe	Ser	Asn	260	265	270	
Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn	275	280	285	
Cys	Ile	Arg	Pro	Asn	Gln	Asn	Thr	Arg	Arg	Ser	Ile	His	Ile	Gly	Pro	290	295	300	
Gly	Ser	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln	305	310	315	320
Ala	His	Cys	Asn	Ile	Gln	Gly	Thr	Gln	Trp	Gln	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	325	330	335	
Ile	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Gln	Phe	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe	340	345	350	
Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	Ile	Val	Met	His	Ser	Phe	Asn	355	360	365	
Cys	Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Thr	Gln	Leu	Phe	Asn	Ser	370	375	380	
Ile	Trp	Met	Leu	Asn	Asn	Thr	Trp	Asp	Gly	Thr	Lys	Glu	Glu	Asn	Ile	385	390	395	400
Thr	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	Glu	Val	405	410	415	

Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser
 420 425 430

Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr
 435 440 445

Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460

Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480

Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495

Lys Arg

<210> 14

<211> 669

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g12

<400> 14

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
 20 25 30

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

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

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

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95

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

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

Asn	Cys	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ser	Asn	Asp	Thr	Thr	Lys	Glu	Thr	130	135	140	
Gly	Ile	Lys	Lys	Cys	Ser	Phe	Asn	Ile	Thr	Thr	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	145	150	155	160
Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asp	Val	Val	Pro	165	170	175	
Ile	Asp	Asn	Ser	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Leu	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Ser	180	185	190	
Val	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ile	Pro	Ile	195	200	205	
His	Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Asn	Glu	210	215	220	
Thr	Phe	Asp	Gly	Lys	Gly	Pro	Cys	Thr	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	225	230	235	240
Thr	His	Gly	Ile	Arg	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	245	250	255	
Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Asp	Asn	Phe	Ser	Asn	260	265	270	
Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn	275	280	285	
Cys	Ile	Arg	Pro	Asn	Gln	Asn	Thr	Arg	Arg	Ser	Ile	His	Ile	Gly	Pro	290	295	300	
Gly	Ser	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln	305	310	315	320
Ala	His	Cys	Asn	Ile	Gln	Gly	Thr	Gln	Trp	Gln	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	325	330	335	
Ile	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Gln	Phe	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe	340	345	350	
Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	Ile	Val	Met	His	Ser	Phe	Asn	355	360	365	
Cys	Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Thr	Gln	Leu	Phe	Asn	Ser	370	375	380	

Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile
 385 390 395 400
 Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 405 410 415
 Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser
 420 425 430
 Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr
 435 440 445
 Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460
 Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480
 Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495
 Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 500 505 510
 Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln
 515 520 525
 Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu
 530 535 540
 Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly
 545 550 555 560
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly
 565 570 575
 Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 580 585 590
 Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys
 595 600 605
 Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp
 610 615 620
 Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln
 625 630 635 640

Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 645 650 655

Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr
 660 665

<210> 15

<211> 844

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g112

<400> 15

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
 20 25 30

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

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

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

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95

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

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

Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
 130 135 140

Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160

Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175

Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser

	180		185		190
Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile					
	195		200		205
His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu					
	210		215		220
Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys					
	225		230		240
Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly					
		245		250	255
Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Ser Asn					
	260		265		270
Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn					
	275		280		285
Cys Ile Arg Pro Asn Gln Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro					
	290		295		300
Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln					
	305		310		320
Ala His Cys Asn Ile Gln Gly Thr Gln Trp Gln Lys Thr Leu Ser Leu					
		325		330	335
Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Gln Lys Thr Ile Ile Phe					
	340		345		350
Arg Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn					
	355		360		365
Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser					
	370		375		380
Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile					
	385		390		400
Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val					
		405		410	415
Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser					
	420		425		430
Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr					

435	440	445
Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp		
450	455	460
Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro		
465	470	475
Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu		
485	490	495
Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly		
500	505	510
Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln		
515	520	525
Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu		
530	535	540
Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly		
545	550	555
Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly		
565	570	575
Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys		
580	585	590
Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys		
595	600	605
Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp		
610	615	620
Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln		
625	630	635
Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser		
645	650	655
Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile		
660	665	670
Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Thr		
675	680	685
Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser		

690	695	700
Leu Glu Thr Arg	Leu Pro Thr Gln Arg Gly Pro Asp Arg	Pro Glu Gly
705	710	715 720
Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Thr Ser Gly Gln Leu	725	730 735
Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Val Asp Leu Arg Ser Leu Cys	740	745 750
Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg	755	760 765
Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Leu	770	775 780
Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Lys Ser Ala Val	785	790 795 800
Ser Leu Phe Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg	805	810 815
Ile Ile Glu Val Ile Gln Arg Ala Tyr Arg Ala Ile Leu His Ile Pro	820	825 830
Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Leu Leu Leu	835	840

<210> 16
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> VIH-1 mutant g112

<400> 16
Met Arg Val Lys Glu Ile Arg Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp
1 5 10 15
Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
20 25 30
Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
35 40 45
Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
50 55 60

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

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95

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

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

Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
 130 135 140

Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160

Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175

Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser
 180 185 190

Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 195 200 205

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu
 210 215 220

Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 225 230 235 240

Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 245 250 255

Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Ser Asn
 260 265 270

Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn
 275 280 285

Cys Ile Arg Pro Asn Gln Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro
 290 295 300

Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 305 310 315 320

Ala His Cys Asn Ile Gln Gly Thr Gln Trp Gln Lys Thr Leu Ser Leu
325 330 335

Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Gln Lys Thr Ile Ile Phe
340 345 350

Arg Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn
355 360 365

Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser
370 375 380

Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile
385 390 395 400

Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
405 410 415

Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser
420 425 430

Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr
435 440 445

Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
450 455 460

Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
465 470 475 480

Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
485 490 495

Lys Arg

<210> 17

<211> 669

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g112

<400> 17

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
20 25 30

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
 35 40 45
 Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
 50 55 60
 His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95
 Asn Ser Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
 100 105 110
 Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
 115 120 125
 Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
 130 135 140
 Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175
 Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser
 180 185 190
 Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 195 200 205
 His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu
 210 215 220
 Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 225 230 235 240
 Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 245 250 255
 Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Ser Asn
 260 265 270
 Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn
 275 280 285

Cys Ile Arg Pro Asn Gln Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro
 290 295 300

Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 305 310 315 320

Ala His Cys Asn Ile Gln Gly Thr Gln Trp Gln Lys Thr Leu Ser Leu
 325 330 335

Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Gln Lys Thr Ile Ile Phe
 340 345 350

Arg Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn
 355 360 365

Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser
 370 375 380

Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 405 410 415

Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser
 420 425 430

Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr
 435 440 445

Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460

Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480

Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495

Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 500 505 510

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln
 515 520 525

Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu
 530 535 540

Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly
 545 550 555 560
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly
 565 570 575
 Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 580 585 590
 Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys
 595 600 605
 Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp
 610 615 620
 Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln
 625 630 635 640
 Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 645 650 655
 Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr
 660 665

 <210> 18
 <211> 844
 <212> PRT
 <213> VIH-1 mutant g14

 <400> 18
 Met Arg Val Lys Glu Ile Arg Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp
 1 5 10 15
 Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
 20 25 30
 Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
 35 40 45
 Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
 50 55 60
 His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn

	85		90		95
Asn Ser Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp					
	100		105		110
Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu					
	115		120		125
Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr					
	130		135		140
Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp					
145		150		155	160
Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro					
	165		170		175
Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser					
	180		185		190
Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile					
	195		200		205
His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu					
	210		215		220
Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys					
225		230		235	240
Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly					
	245		250		255
Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Gln Phe Ser Asn					
	260		265		270
Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn					
	275		280		285
Cys Ile Arg Pro Asn Gln Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro					
	290		295		300
Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln					
305		310		315	320
Ala His Cys Asn Ile Asn Gly Thr Gln Trp Asn Lys Thr Leu Ser Leu					
	325		330		335
Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe					

	340		345		350
Arg Asn Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn					
355		360		365	
Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser					
370		375		380	
Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile					
385		390		395	400
Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val					
	405		410		415
Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser					
	420		425		430
Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr					
	435		440		445
Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp					
	450		455		460
Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro					
465		470		475	480
Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu					
	485		490		495
Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly					
	500		505		510
Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln					
	515		520		525
Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu					
	530		535		540
Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly					
545		550		555	560
Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly					
	565		570		575
Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys					
	580		585		590
Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys					

595	600	605
Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp		
610	615	620
Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln		
625	630	635 640
Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser		
645	650	655
Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile		
660	665	670
Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Thr		
675	680	685
Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser		
690	695	700
Leu Glu Thr Arg Leu Pro Thr Gln Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly		
705	710	715 720
Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Thr Ser Gly Gln Leu		
725	730	735
Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Val Asp Leu Arg Ser Leu Cys		
740	745	750
Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg		
755	760	765
Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Leu		
770	775	780
Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Lys Ser Ala Val		
785	790	795 800
Ser Leu Phe Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg		
805	810	815
Ile Ile Glu Val Ile Gln Arg Ala Tyr Arg Ala Ile Leu His Ile Pro		
820	825	830
Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Leu Leu Leu		
835	840	

<210> 19

<211> 498

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g14

<400> 19

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
 20 25 30

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

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

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

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95

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

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

Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
 130 135 140

Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160

Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175

Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser
 180 185 190

Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 195 200 205

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu
 210 215 220

Thr	Phe	Asp	Gly	Lys	Gly	Pro	Cys	Thr	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys
225					230					235					240
Thr	His	Gly	Ile	Arg	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly
				245					250					255	
Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Asp	Gln	Phe	Ser	Asn
			260						265				270		
Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn
		275						280					285		
Cys	Ile	Arg	Pro	Asn	Gln	Asn	Thr	Arg	Arg	Ser	Ile	His	Ile	Gly	Pro
	290						295					300			
Gly	Ser	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln
305					310					315					320
Ala	His	Cys	Asn	Ile	Asn	Gly	Thr	Gln	Trp	Asn	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu
				325					330					335	
Ile	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Gln	Phe	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe
			340					345					350		
Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	Ile	Val	Met	His	Ser	Phe	Asn
		355					360					365			
Cys	Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Thr	Gln	Leu	Phe	Asn	Ser
	370						375				380				
Ile	Trp	Met	Leu	Asn	Asn	Thr	Trp	Asp	Gly	Thr	Lys	Glu	Glu	Asn	Ile
385					390					395					400
Thr	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	Glu	Val
				405						410				415	
Gly	Lys	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Lys	Gly	Gln	Ile	Arg	Cys	Ser
			420						425				430		
Ser	Asn	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly	Gly	Asn	Thr
		435						440				445			
Ser	Ser	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Arg	Asp
	450						455				460				
Asn	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val	Val	Lys	Ile	Glu	Pro
465					470					475				480	

Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495

Lys Arg

<210> 20

<211> 669

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g14

<400> 20

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
 20 25 30

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

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

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

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95

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

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

Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
 130 135 140

Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160

Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175

Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser
 180 185 190

Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 195 200 205

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu
 210 215 220

Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 225 230 235 240

Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 245 250 255

Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Gln Phe Ser Asn
 260 265 270

Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn
 275 280 285

Cys Ile Arg Pro Asn Gln Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro
 290 295 300

Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 305 310 315 320

Ala His Cys Asn Ile Asn Gly Thr Gln Trp Asn Lys Thr Leu Ser Leu
 325 330 335

Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe
 340 345 350

Arg Asn Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn
 355 360 365

Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser
 370 375 380

Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 405 410 415

Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser
 420 425 430

Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr
 435 440 445

Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460
 Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480
 Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495
 Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 500 505 510
 Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln
 515 520 525
 Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu
 530 535 540
 Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly
 545 550 555 560
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly
 565 570 575
 Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 580 585 590
 Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys
 595 600 605
 Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp
 610 615 620
 Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln
 625 630 635 640
 Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 645 650 655
 Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr
 660 665

<210> 21

<211> 2535

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g22

<400> 21

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaaccccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtca ttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaca acaacacaag agaagtata 900
catataggac caggggagcg attttataca acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtcta atgttgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaataca gaaaacaata atctttaggc agtcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggtat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgccctc ccatcaaagg acaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggt acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggtat tgaggcgcaa cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaagg acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggt gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
tttgacataa caaactggct gtggtatata aaaatattca taatgatagt aggaggcttg 2040
ataggtttta gaatagtttt tactgtactt tctatagtga atagagttag gcagggatac 2100
tcaccattat cgttgagac ccgcctccca acccagaggg gacctgacag gcccgaggga 2160
atcgaagaag aaggtggaga gagagacaga gacacatccg gtcaattagt gaatggattc 2220
ttagcaatta tctgggtcga cctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca ccgcttgaga 2280
gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttcttg gacgcagggg gtgggaagcc 2340
ctcaagtatt tgtggaatct cctccagtat tggagtcagg aactaaagaa gagtgtgtt 2400
agcttgttca atgccatagc catagcagta gctgagggga cagataggat aatagaagta 2460
atacaaaggg cttatagggc cattctccac atacctagaa gaataagaca gggcttggaa 2520
aggcttttgc tataa 2535

```

<210> 22

<211> 2007

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g22

<400> 22

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60
cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtc tttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaaca acaacacaag aagaagtata 900
catataggac caggggagcgc attttataca acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtctaag agttgataaa 1020
ttaagaaac aatttaatac gaaaacaata atcttttaggc agtcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgtttaata gtatttggtat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcatcaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtgggtg agagagaaaa aagagcagtg 1500
ggaatgctag gagccatgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca 1560
gcgtcactgg cgttgacggc acaggccaga caagtattgt ctggtatagt gcaacagcag 1620
aacaatttgc tgagggctat tgagggcga cagcacctgt tgcaactcac agtctggggc 1680
atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct gtggaaaggt acctagggga tcaacagctc 1740
ctgggaattt ggggttgctc tggaaaactc atctgcacca ctgctgtgcc ttggaatgat 1800
agttggagta ataaatctct gaaatatatt tgggataaca tgacctggat gcagtgggaa 1860
aaagaaattg acaccacat aggcacaata taccaattaa ttgaagaatc gcagtaccaa 1920
caagaaaaga atgaaaaga attattggaa ctagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1980
tttgacataa caaactggct gtgggtat

```

2007

<210> 23

<211> 1494

<212> ADN

<213> VIH-1 mutant g22

<400> 23

```

atgagagtga aggagatcag gaggaattat cagcacttgt ggagatgggg cacgatgctc 60

```

```

cttgggatgt tcatgatctg tagtgcagaa gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
gatacagagg tacataatgt ctgggccaca catgcctgtg taccacacaga cccaaccca 240
cgagaagtag taatgggaaa tgtgacagaa gaatttaaca tatggaacaa tagcatggta 300
gaacagatgc atgaagatat aattagttta tgggatcaaa gtctaaagcc atgtgtaaaa 360
ttaacccac tctgtgttac tttaaattgc actaactaca atagtactag taatgatact 420
accaaggaaa caggaataaaa aaaatgctct ttcaatatca ccacctcagg cgtaaaagat 480
aggtttacga aggaaaatgc acttttgtat acagctgatg tagtaccaat agataatagt 540
agtatcaact ataggttgat aggttgtaac acctcagtca ttaccaggc ctgtccaaag 600
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaag 660
tgtaataatg aaacattcga tggaaaagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 720
acacatggaa ttagaccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 780
acagaggtag taattagatc tgacaatttc tcgaacaatg ctaaaaccat aatagtacaa 840
ctgacagaac ctgtagtaat caattgtata agaccaca acaacacaag aagaagtata 900
catataggac cagggagcgc attttatata acaggacaaa taataggaga tataagacaa 960
gcacattgta acattcaggg aacacaatgg cagaaaactt taagtcta atgttgataaa 1020
ttaaagaaac aatttaatca gaaaacaata atctttaggc agtcctcagg aggggaccca 1080
gaaattgtaa tgcacagttt taactgtgga ggggaatttt tctactgtaa tacaacacaa 1140
ctgttttaata gtatttggat gcttaataat acttgggatg gtactaaaga ggaaaatatt 1200
acactcccat gcagaataaaa acaaattata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg 1260
tatgcccctc ccatcaaagg acaaattaga tgttcacaa acattacagg gctgctatta 1320
acaagagatg gtggtggtaa cagcagcagc gataatgaga ccttcagacc tggaggagga 1380
gatatgaggg ataattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 1440
ttaggagtag caccaccaa ggcaaggaga agagtggc agagagaaaa aaga 1494

```

<210> 24

<211> 844

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g22

<400> 24

```

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

```

```

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
                20                      25                     30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn

```

					85						90					95
Asn	Ser	Met	Val	Glu	Gln	Met	His	Glu	Asp	Ile	Ile	Ser	Leu	Trp	Asp	
			100					105					110			
Gln	Ser	Leu	Lys	Pro	Cys	Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	Val	Thr	Leu	
			115				120					125				
Asn	Cys	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ser	Asn	Asp	Thr	Thr	Lys	Glu	Thr	
			130				135					140				
Gly	Ile	Lys	Lys	Cys	Ser	Phe	Asn	Ile	Thr	Thr	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	
145					150				155					160		
Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ala	Asp	Val	Val	Pro	
				165					170					175		
Ile	Asp	Asn	Ser	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Leu	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Ser	
			180					185					190			
Val	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ile	Pro	Ile	
			195				200					205				
His	Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Asn	Glu	
			210			215					220					
Thr	Phe	Asp	Gly	Lys	Gly	Pro	Cys	Thr	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	
225					230					235				240		
Thr	His	Gly	Ile	Arg	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	
				245					250					255		
Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Asp	Asn	Phe	Ser	Asn	
			260					265					270			
Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn	
			275				280					285				
Cys	Ile	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Arg	Ser	Ile	His	Ile	Gly	Pro	
			290			295				300						
Gly	Ser	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln	
305					310				315					320		
Ala	His	Cys	Asn	Ile	Gln	Gly	Thr	Gln	Trp	Gln	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	
				325				330					335			
Ile	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Gln	Phe	Asn	Gln	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe	

340	345	350
Arg Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn		
355	360	365
Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser		
370	375	380
Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile		
385	390	400
Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val		
	405	410 415
Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser		
	420	425 430
Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr		
	435	440 445
Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp		
	450	455 460
Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro		
465	470	475 480
Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu		
	485	490 495
Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly		
	500	505 510
Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln		
	515	520 525
Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu		
	530	535 540
Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly		
545	550	555 560
Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly		
	565	570 575
Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys		
	580	585 590
Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys		

595	600	605
Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp		
610	615	620
Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln		
625	630	635
		640
Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser		
	645	650
		655
Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile		
	660	665
		670
Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Thr		
	675	680
		685
Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser		
	690	695
		700
Leu Glu Thr Arg Leu Pro Thr Gln Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly		
705	710	715
		720
Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Thr Ser Gly Gln Leu		
	725	730
		735
Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Val Asp Leu Arg Ser Leu Cys		
	740	745
		750
Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg		
	755	760
		765
Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Leu		
	770	775
		780
Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Lys Ser Ala Val		
785	790	795
		800
Ser Leu Phe Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg		
	805	810
		815
Ile Ile Glu Val Ile Gln Arg Ala Tyr Arg Ala Ile Leu His Ile Pro		
	820	825
		830
Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Leu Leu Leu		
	835	840

<210> 25

<211> 669

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g22

<400> 25

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
 20 25 30

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

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

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

Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95

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

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

Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
 130 135 140

Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160

Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175

Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser
 180 185 190

Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 195 200 205

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu
 210 215 220

Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys			
225	230	235	240
Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly			
	245	250	255
Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Ser Asn			
	260	265	270
Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn			
	275	280	285
Cys Ile Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro			
	290	295	300
Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln			
305	310	315	320
Ala His Cys Asn Ile Gln Gly Thr Gln Trp Gln Lys Thr Leu Ser Leu			
	325	330	335
Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Gln Lys Thr Ile Ile Phe			
	340	345	350
Arg Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn			
	355	360	365
Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser			
	370	375	380
Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile			
385	390	395	400
Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val			
	405	410	415
Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser			
	420	425	430
Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr			
	435	440	445
Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp			
	450	455	460
Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro			
465	470	475	480

Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495

Lys Arg Ala Val Gly Met Leu Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 500 505 510

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Val Gln
 515 520 525

Ala Arg Gln Val Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu
 530 535 540

Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly
 545 550 555 560

Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly
 565 570 575

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 580 585 590

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Asp Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Lys
 595 600 605

Tyr Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Glu Lys Glu Ile Asp
 610 615 620

Thr His Ile Gly Thr Ile Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Ser Gln Tyr Gln
 625 630 635 640

Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 645 650 655

Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr
 660 665

<210> 26

<211> 498

<212> PRT

<213> VIH-1 mutant g22

<400> 26

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

Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Phe Met Ile Cys Ser Ala Glu Glu Gln
 20 25 30

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
 35 40 45
 Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
 50 55 60
 His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Val Met Gly Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Ile Trp Asn
 85 90 95
 Asn Ser Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
 100 105 110
 Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
 115 120 125
 Asn Cys Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Ser Asn Asp Thr Thr Lys Glu Thr
 130 135 140
 Gly Ile Lys Lys Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Gly Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Arg Phe Thr Lys Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Asp Val Val Pro
 165 170 175
 Ile Asp Asn Ser Ser Ile Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Cys Asn Thr Ser
 180 185 190
 Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 195 200 205
 His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Glu
 210 215 220
 Thr Phe Asp Gly Lys Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 225 230 235 240
 Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 245 250 255
 Ser Leu Ala Glu Thr Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Ser Asn
 260 265 270
 Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Thr Glu Pro Val Val Ile Asn
 275 280 285

Cys Ile Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Arg Ser Ile His Ile Gly Pro
 290 295 300
 Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 305 310 315 320
 Ala His Cys Asn Ile Gln Gly Thr Gln Trp Gln Lys Thr Leu Ser Leu
 325 330 335
 Ile Val Asp Lys Leu Lys Lys Gln Phe Asn Gln Lys Thr Ile Ile Phe
 340 345 350
 Arg Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn
 355 360 365
 Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser
 370 375 380
 Ile Trp Met Leu Asn Asn Thr Trp Asp Gly Thr Lys Glu Glu Asn Ile
 385 390 395 400
 Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 405 410 415
 Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Gln Ile Arg Cys Ser
 420 425 430
 Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Gly Asn Thr
 435 440 445
 Ser Ser Asp Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460
 Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480
 Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Arg Arg Arg Val Val Gln Arg Glu
 485 490 495
 Lys Arg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No
PCT/FR 02/03039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/16 C07K16/10 C12N15/48 A61K48/00 A61K39/21
A61K39/395 A61P31/18 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, SCISEARCH, EMBASE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRAND DENYS ET AL: "Antigenic properties of recombinant envelope glycoproteins derived from T-cell-line-adapted isolates or primary human immunodeficiency virus isolates and their relationship to immunogenicity." VIROLOGY, vol. 271, no. 2, 5 June 2000 (2000-06-05), pages 350-362, XP002227026 ISSN: 0042-6822 the whole document	1-29
Y	WO 99 24464 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;HENDRICKSON WAYNE A (US); SODROSKI JO) 20 May 1999 (1999-05-20) cited in the application page 11, line 9 - line 22 claims 1,5	1-29
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January 2003

Date of mailing of the international search report

31/01/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niemann, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/03039

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 17705 A (HARVARD COLLEGE) 16 September 1993 (1993-09-16) page 2, line 28 -page 3, line 34 page 15, line 3 - line 22 page 18, line 25 -page 20, line 14; tables 1,3 ---	1-29
Y	WO 98 41536 A (DESROSIERS RONALD C ;HARVARD COLLEGE (US); REITTER JULIE N (US)) 24 September 1998 (1998-09-24) page 3, line 15 -page 4, line 14 ---	1-29
Y	LEE W-R ET AL: "NONRANDOM DISTRIBUTION OF GP120 N-LINKED GLYCOSYLATION SITED IMPORTANT FOR INFECTIVITY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 89, no. 6, 1 March 1992 (1992-03-01), pages 2213-2217, XP000673663 ISSN: 0027-8424 cited in the application abstract ---	1-29
A	KWONG P D ET AL: "Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates." STRUCTURE WITH FOLDING & DESIGN. ENGLAND 15 DEC 2000, vol. 8, no. 12, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 1329-1339, XP002227027 ISSN: 0969-2126 cited in the application the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati .pplication No
PCT/FR 02/03039

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9924464	A	20-05-1999	AU 1396299 A	31-05-1999
			AU 1396399 A	31-05-1999
			AU 1521199 A	31-05-1999
			EP 1037963 A1	27-09-2000
			WO 9924553 A2	20-05-1999
			WO 9924464 A1	20-05-1999
			WO 9924465 A1	20-05-1999
			AU 1454599 A	31-05-1999
			WO 9924065 A1	20-05-1999
WO 9317705	A	16-09-1993	US 6103238 A	15-08-2000
			CA 2131909 A1	16-09-1993
			EP 0631506 A1	04-01-1995
			JP 7504569 T	25-05-1995
			WO 9317705 A1	16-09-1993
WO 9841536	A	24-09-1998	AU 6535898 A	12-10-1998
			WO 9841536 A1	24-09-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No
PCT/FR 02/03039

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/16 C07K16/10 C12N15/48 A61K48/00 A61K39/21
A61K39/395 A61P31/18 G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, SCISEARCH, EMBASE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	BRAND DENYS ET AL: "Antigenic properties of recombinant envelope glycoproteins derived from T-cell-line-adapted isolates or primary human immunodeficiency virus isolates and their relationship to immunogenicity." VIROLOGY, vol. 271, no. 2, 5 juin 2000 (2000-06-05), pages 350-362, XP002227026 ISSN: 0042-6822 le document en entier	1-29
Y	WO 99 24464 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;HENDRICKSON WAYNE A (US); SODROSKI JO) 20 mai 1999 (1999-05-20) cité dans la demande page 11, ligne 9 - ligne 22 revendications 1,5	1-29
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 janvier 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/01/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Niemann, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No
PCT/FR 02/03039

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 93 17705 A (HARVARD COLLEGE) 16 septembre 1993 (1993-09-16) page 2, ligne 28 -page 3, ligne 34 page 15, ligne 3 - ligne 22 page 18, ligne 25 -page 20, ligne 14; tableaux 1,3 ----	1-29
Y	WO 98 41536 A (DESROSIERS RONALD C ;HARVARD COLLEGE (US); REITTER JULIE N (US)) 24 septembre 1998 (1998-09-24) page 3, ligne 15 -page 4, ligne 14 ----	1-29
Y	LEE W-R ET AL: "NONRANDOM DISTRIBUTION OF GPI20 N-LINKED GLYCOSYLATION SITED IMPORTANT FOR INFECTIVITY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 89, no. 6, 1 mars 1992 (1992-03-01), pages 2213-2217, XP000673663 ISSN: 0027-8424 cité dans la demande abrégé ----	1-29
A	KWONG P D ET AL: "Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates." STRUCTURE WITH FOLDING & DESIGN. ENGLAND 15 DEC 2000, vol. 8, no. 12, 15 décembre 2000 (2000-12-15), pages 1329-1339, XP002227027 ISSN: 0969-2126 cité dans la demande le document en entier -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/03039

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9924464 A	20-05-1999	AU 1396299 A	31-05-1999
		AU 1396399 A	31-05-1999
		AU 1521199 A	31-05-1999
		EP 1037963 A1	27-09-2000
		WO 9924553 A2	20-05-1999
		WO 9924464 A1	20-05-1999
		WO 9924465 A1	20-05-1999
		AU 1454599 A	31-05-1999
		WO 9924065 A1	20-05-1999
WO 9317705 A	16-09-1993	US 6103238 A	15-08-2000
		CA 2131909 A1	16-09-1993
		EP 0631506 A1	04-01-1995
		JP 7504569 T	25-05-1995
		WO 9317705 A1	16-09-1993
WO 9841536 A	24-09-1998	AU 6535898 A	12-10-1998
		WO 9841536 A1	24-09-1998