



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 274 100**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02774586 .8**

(86) Fecha de presentación : **09.09.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1423417**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

(54) Título: **Anticuerpos que reconocen a un péptido que imita a un epítipo críptico de gp41 del VIH-1.**

(30) Prioridad: **07.09.2001 US 318091 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

(73) Titular/es: **Polymun Scientific Immunbiologische
Forschung GmbH
Nussdorfer Lande 11
1190 Wien, AT**

(72) Inventor/es: **Stiegler, Gabriela;
Kunert, Renate y
Katinger, Hermann**

(74) Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 274 100 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que reconocen a un péptido que imita a un epítipo críptico de gp41 del VIH-1.

5 **Campo técnico**

La presente invención se encuentra en los campos de la microbiología aplicada y el desarrollo de vacunas y se refiere a anticuerpos que reconocen a un epítipo críptico sobre la gp41 del VIH-1 y a aplicaciones de estos anticuerpos para propósitos terapéuticos de diagnóstico.

10

Antecedentes

Se ha demostrado que la presencia de anticuerpos específicos desempeña un papel importante en la protección frente a numerosas enfermedades víricas humanas. Sin embargo, el papel de la respuesta inmune humoral en la infección por VIH todavía resulta controvertido. Hay indicaciones de que el desarrollo de una amplia respuesta inmune neutralizante, tal como aparece en personas en las que la enfermedad no progresa a largo plazo, retrasa la progresión de la enfermedad en contraste con las personas en las que la enfermedad progresa rápidamente en las que los valores de anticuerpos neutralizantes son a menudo bajos. Otros estudios han sugerido que las madres con altos valores de anticuerpos neutralizantes presentan menos probabilidad de transmitir el virus a sus hijos. Se ha observado una correlación general entre la presencia de anticuerpos neutralizantes y las manifestaciones de la enfermedad. Además, una disminución en las respuestas mediadas por anticuerpos frente al VIH a menudo predice un mal diagnóstico.

Se han realizado numerosos ensayos en animales y seres humanos para estudiar el papel de los anticuerpos en la infección por VIH-1. La infusión de anticuerpos neutralizantes específicos frente a VIH-1 a chimpancés y macacos seguida de una exposición intravenosa o mucosa con VIH o el virus quimérico de la inmunodeficiencia humana/de los simios (SHIV) previno la infección o la progresión de la enfermedad. También se observaron efectos positivos de la inmunización pasiva con preparaciones de anticuerpos monoclonales o policlonales frente al VIH-1 en una serie de ensayos en voluntarios humanos. Por ejemplo, los dos anticuerpos monoclonales humanos 2F5 (nº de acceso ECACC 90091704) y 2G12 (nº de acceso ECACC 93091517) mostraron efectos beneficiosos en un ensayo clínico de fase I. Repetidas infusiones de ambos anticuerpos a pacientes VIH positivos dieron como resultado la reducción de las cargas virales y de las células mononucleares periféricas infectadas (PBMC), un incremento de los linfocitos CD4+ y la activación del complemento.

Hasta la fecha, el número de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopos conservados y que se sabe que tienen un elevado potencial terapéutico es reducido (D'Souza y col., J Infect Dis 1997; 175: 1056-1062). Se ha notificado que únicamente tres anticuerpos monoclonales (Acm) 2F5, 2G12 (Buchacher y col., AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 359-369) e IgG1b12 (Burton y col., Science 1994; 266: 1024-1027) muestran una actividad antiviral entre clados. La identificación de anticuerpos monoclonales para epítopos conservados neutralizantes de células B sobre la envoltura del VIH-1 no sólo puede ser valiosa para estrategias de inmunización pasiva, sino que también aporta información importante para un diseño de vacuna basado en la inducción de una amplia respuesta inmune humoral. Hay indicaciones de que una vacuna basada exclusivamente en epítopos de células T probablemente no sería suficiente para proteger frente a la infección por VIH-1 (Parren y col., AIDS 1999; 13 (suplemento A): S137-S162).

Hace algunos años se estableció un panel de treinta y tres anticuerpos monoclonales humanos frente al VIH-1 por inmortalización de linfocitos humanos de sangre periférica de donantes VIH-1 positivos. De este panel, dos anticuerpos (2F5, 2G12) fueron identificados como potentes inhibidores de aislados de laboratorio y primarios de VIH-1. Los Acm 2F5 y 2G12 se desarrollaron adicionalmente y pronto se reconoció que son de los anticuerpos neutralizantes más potentes. El anticuerpo monoclonal 4E10 (nº de acceso ECACC 90091703), originalmente un anticuerpo IgG3 se incluyó en un programa de evaluación del Proyecto Sexológico de Anticuerpos (Antibody Serological Project, ASP) y demostró neutralizar algunas cepas de laboratorio (D'Souza y col., AIDS 1994; 8: 169-181). El paso de anticuerpos del isotipo 63 al isotipo 68 se describe en Biotech, Bioeng 67 (1), páginas 97-103.

Breve descripción de la invención

55

Ahora se clonó el Acm 4E10 en una línea celular continua CHO como un anticuerpo de clase IgG1 en el que las regiones constantes de las cadenas pesadas eran idénticas a las de los Acm recombinantes 2F5 y 2G12. Sorprendentemente, después de este cambio de clase de IgG3 a IgG1, el Acm 4E10 mostró una potencia de neutralización aumentada. De hecho, en contra de lo que se esperaba, el Acm 4E10 en su versión IgG1, y no en su versión IgG3 fue el único anticuerpo que neutralizó todos los aislados primarios derivados de individuos VIH-1 positivos que participaban en un ensayo clínico de fase I con los Acm 2F5 y 2G12. Asimismo, neutralizó aislados primarios de VIH-1 que eran insensibles a la neutralización por uno o ambos Acm 2F5 y 2G12.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un anticuerpo 4E10 mejorado de clase IgG1 que tiene una actividad neutralizantes de VIH-1 significativamente aumentada en comparación con el Acm anteriormente conocido 4E10 de clase IgG3 (nº de acceso ECACC 90091703) y que neutraliza aislados primarios de VIH-1 que son insensibles a la neutralización por uno o ambos Acm 2F5 y 2G12. Es otro objeto de la presente invención proporcionar procedimientos de uso del Acm de clase IgG1 4E10 (de ahora en adelante llamado 4E10-IgG1) para fines diagnósticos

65

y terapéuticos así como para obtener o detectar sistemáticamente anticuerpos anti-idiotípicos que son capaces de inhibir o prevenir la acción neutralizante de VIH-1 del Acm 4E10-IgG1.

El término “4E10”, como se usa de ahora en adelante en este documento se refiere al anticuerpo monoclonal humano 4E10 tanto en la variante IgG3 como en la variante IgG1, a menos que se indique expresamente lo contrario. Sin embargo, en los ejemplos y en los dibujos correspondientes, el término “4E10” típicamente se refiere a la variante IgG1 porque los experimentos descritos en los mismos se han realizado usando la variante IgG1 del 4E10. El término “4E10-IgG3” debe referirse exclusivamente a la variante IgG3 conocida y el término “4E10-IgG1” a la variante IgG1 de 4E10. El Acm 4E10-IgG3 es producido por una línea celular de hibridoma depositada en el ECACC con el n° de acceso 90091703, mientras que el 4E10-IgG1 es expresado por una línea celular CHO (depositada bajo el tratado de Budapest en el ECACC con el n° de acceso 01110665). Ambas variantes reconocen el mismo epítipo en la gp41 del VIH-1. Difieren significativamente, sin embargo, en su capacidad neutralizante del VIH-1.

Se desvela adicionalmente en el presente documento que el Acm 4E10 reconoce un epítipo desconocido hasta la fecha en la gp41 en una situación C-terminal respecto al epítipo 2F5. La detección sistemática del Acm 4E10 frente a aislados de VIH-1 adaptados a líneas de células T (TCLA) y aislados primarios de VIH-1 de diferentes clados indica que este anticuerpo puede ser al menos tan potente como 2F5 y 2G12 en su potencial neutralizante. En el presente documento se describen también las propiedades neutralizantes *in vitro* del 4E10-IgG1 en comparación con otros anticuerpos monoclonales bien caracterizados.

También es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende 4E10-IgG1 en combinación con un vehículo adecuado, y opcionalmente mezclado con al menos un anticuerpo diferente, preferiblemente seleccionado entre el grupo constituido por 2F5 y 2G12.

Es otro objeto más de la invención proporcionar el uso de tales composiciones farmacéuticas en el tratamiento profiláctico o terapéutico de personas en peligro o infectadas por VIH-1 y particularmente, para la prevención o la terapia del SIDA.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Unión de 2F5 y 4E10 a los péptidos 2030, 2031 y gp160_{III}. Se recubrieron durante toda la noche diluciones seriadas por duplicado sobre placas de ELISA antes de la incubación con cantidades constantes de 4E10 o 2F5 (100 ng/ml). Se detectó la unión con anticuerpo de cabra anti IgG(γ) conjugado con peroxidasa de rábano.

Fig. 2: Neutralización de aislado primario S2/05 por 2F5, 2G12, 4E10 e IgG1b12. El ensayo se realizó sobre PBMC usando la producción de p24 como un marcador de la replicación. La cantidad de p24 en el cultivo sin Acm era de 195 ng/ml.

Figs 3A, B: Inhibición de la unión del Acm 4E10 a placas de ELISA previamente recubiertas con (A) gp41 o (B) péptido 2031 después de la incubación previa del Acm 4E10 con gp41 o péptido 2031. Se incubaron previamente diluciones seriadas por duplicado de los péptidos gp41 o 2031 con cantidades constantes de 4E10 (250 ng/ml) antes de la adición a las placas recubiertas con gp41 o péptido 2031. La unión del anticuerpo se detectó con anticuerpo de cabra anti IgG(γ) conjugado con peroxidasa de rábano.

Figs 4A, B, C: Neutralización del aislado primario P6/7 por 2F5, 2G12, 4E10 e IgG1b12 y combinaciones dobles (1:1). Se indican los índices de combinación al 50% del neutralización (IC₅₀). El ensayo se realizó sobre PBMC usando la producción de p24 como marcador de la replicación. La cantidad de p24 en el cultivo sin anticuerpo fue de 96 ng/ml. Se determinó el la sinergia por el procedimiento de Chou-Talay en el que un IC<1 indica sinergia.

Descripción detallada de la invención

En un programa de evaluación del grupo de trabajo en sobre selección de anticuerpos del grupo de ensayos clínicos sobre el SIDA, únicamente los Acm 2F5, 2G12, e IgG1b12 se identificaron como candidatos potentes para la inmunoterapia pasiva anti VIH-1. Nuestros recientes descubrimientos presentados en este documento muestran que el 4E10-IgG1 es un anticuerpo de potencial antiviral comparable.

Los estudios de mapeo de epítopos revelaron que el 4E10 reconoce un epítipo sobre el ectodominio de la gp41. Dado que el 4E10 no se unió al péptido 2030 de gp160_{MN} (QTQKEKNEQELLELDKWASL) ni al péptido GG-GLELKWASL, no es probable que el epítipo central de 2F5 constituido por los aminoácidos LDKWA contribuya esencialmente a la unión de 4E10 al péptido 2031 de gp160_{MN} (LLELDKWASLWNWFDITNWL). Nuestra conclusión de que los aminoácidos subsiguientes a esta región son responsables del reconocimiento por 4E10 fue confirmada por estudios de mapeo de epítopos adicionales que empleaban bibliotecas de péptidos para el mapeo. Los resultados mostraron que el epítipo central de 4E10 está de hecho situado hacia el extremo C-terminal respecto al epítipo de 2F5 y comprende al menos una secuencia e 6 aminoácidos (aa) idéntico o correspondiente a los aa 672-677 (NWFDTI) de gp41 de HTLV IIIMN aislado de TCLA.

El término “correspondiente” en este contexto significa que la secuencia de aminoácidos del epítipo de 4E10 puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos en gp41 del aislado de VIH-1 a la que se refiere explícitamente o puede

desviarse de la misma debido a la degeneración del código genético o debido a variaciones entre diferentes aislados de VIH-1. Las secuencias desviadas deben no obstante seguir siendo representativas para el motivo de unión o el epítipo reconocido por el Acm 4E10, por ejemplo, deben ser detectables a partir de una biblioteca que contenga fragmentos de gp41 usando 4E10 como una herramienta de detección sistemática. Por ejemplo, la secuencia NWFDIT en los aa 672-677 de gp41 de HTLV IIIMN es equivalente u homóloga a la secuencia NWFNIT que aparece en la misma situación de gp41 de aislado HXB2. Ejemplos adicionales de secuencias equivalentes u homólogas comprenden, pero no se limitan a SWFGIT, TWFGIT, NWFSIT.

La mayoría de los anticuerpos inducidos por gp41 durante la infección natural se dirigen contra los restos en las proximidades de los aa 598-604 y 644-663 (numeración según HIV-1 HXB2; Xu y col., J Virol 1991: 65: 4832-4838). Estos anticuerpos no inhiben la replicación viral y algunos pueden incluso potenciar la capacidad de infección vírica por mecanismos mediados por el complemento. Hasta la fecha, el Acm 2F5 ha sido el único anticuerpo anti-gp41 que mostraba potentes propiedades neutralizantes entre clados. De forma interesante, los anticuerpos específicos parecidos a 2F5 sólo se encuentran raramente en los sueros de individuos infectados con VIH-1. La HIVIG (sueros agrupados de más de 70 donantes positivos para VIH-1) no muestra unión significativa específica similar a 2F5 a gp160 y/o gp41. La región en gp41 a la que se une 2F5 es obviamente críptica al sistema inmune humano durante la infección natural.

Los resultados descritos en el presente documento para el Acm 4E10, otro anticuerpo ampliamente neutralizante de esta región de gp41, cuyo epítipo se ha mapeado ahora en la zona C-terminal al epítipo central de 2F5, confirman que esta región es esencial para la capacidad de infección y replicación virales. Dado que ambos anticuerpos se unen sólo débilmente a células infectadas y virus libres pero muestran potentes actividades neutralizantes, se sugiere un mecanismo similar de 2F5 y 4E10 para la inhibición de la replicación viral. Además, los resultados obtenidos a partir de ensayos de inhibición sincitiales según los cuales la incubación previa de virus con cualquiera de los dos anticuerpos no mejoró la eficacia antiviral de 4E10 o 2F5 puede reforzar esta hipótesis.

De acuerdo con esto, en vista de los descubrimientos de que ambos Acm, a pesar de ser bloqueantes de la entrada (neutralizadores) del VIH-1 altamente activos, sólo se unen débilmente a virus libres y a células infectadas por VIH-1, se concluye que esta región fusogénica sobre gp41 sólo se ve expuesta durante el suceso de la fusión del VIH-1 con la célula hospedadora. Esto puede por un lado dar una explicación adicional de la naturaleza críptica de estos epítipos neutralizantes de 2F5 y 4E10 durante la infección natural. Por otro lado, no se ha descubierto hasta la fecha ningún aislado de VIH-1 que fuese insensible frente a la neutralización por una combinación de estos dos anticuerpos.

El Acm 4E10 inhibe la replicación viral de cepas de TCLA y primarias de VIH-1 ya a concentraciones bastante bajas, comparables a las aplicables cuando se usan 2F5 o 2G12. Ejerce una actividad antiviral entre clados similar cuando se compara con los otros Acm probados. Aunque 2F5 y 4E10 reconocen epítipos adyacentes, no antagonizan entre sí cuando se prueban en combinación. 4E10 resultó ser incluso más eficaz que tanto 2F5 como 2G12 frente a los aislados de VIH-1 obtenidos a partir de pacientes infectados por VIH asintomáticos que participaron en un ensayo clínico de fase I recientemente realizado que empleaba los Acm 2F5 y 2G12. Por otro lado, 4E10 neutralizó únicamente uno de cada seis aislados previamente derivados de pacientes austriacos con SIDA en fase terminal. En el actual panel de aislados primarios, sólo había un aislado distinto (9UG029) que era relativamente resistente a 4E10. Resulta remarcable que estos seis aislados resistentes (es decir, los cinco aislados obtenidos previamente y el aislado actual) usan CXCR4 como correceptor único para la entrada en la célula hospedadora. Todos los demás aislados que mostraban un fenotipo macrófago o doble trópico fueron fácilmente inhibidos por el Acm 4E10. En contraste con esto, todos los virus de TCLA que usaban CXCR4 para la entrada fueron inhibidos a concentraciones de 4E10 reducidas. No obstante, los resultados obtenidos con cepas de TCLA sensibles a la neutralización en un ensayo sincitial basado en células pueden no ser comparables con ensayos basados en PBMC con virus primarios.

El desarrollo de terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) para la infección por VIH-1 ha mejorado increíblemente la situación de individuos VIH-1 positivos, al menos en el mundo desarrollado (Carpenter y col, JAMA 2000; 283: 381-390). No obstante, los efectos secundarios graves y la aparición de virus resistentes a la TARAA generan una necesidad urgente de nuevos enfoques terapéuticos que actúen sobre sitios diana adicionales. El centro de atención actual se concentra en los inhibidores de la entrada, incluyendo anticuerpos monoclonales, moléculas similares a anticuerpos y péptidos. Los Acm 2F5 y 2G12, particularmente cuando se usan combinados, ya han mostrado una eficacia antiviral notable en voluntarios VIH-1 positivos. Se proporciona por lo tanto anticuerpos neutralizantes de VIH-1 adicionales que tienen las características de unión del Acm 4E10.

De acuerdo con esto, en una forma de realización de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal neutralizante de VIH-1 distinto al Acm humano publicado 4E10-IgG3, en el que dicho anticuerpo se une a una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aa 672-677 (aa NWFDIT) de gp41 del aislado de TCLA HTVLIIMN. En una forma de realización preferida, este anticuerpo neutraliza incluso a mutantes de VIH-1 que son insensibles a la neutralización por el Acm 2F5 y/o el Acm 2G12. Un representante de este tipo de anticuerpos neutralizantes es el Acm 4E10-IgG11, es decir, la variante IgG1 del Acm conocido 4E10-IgG3.

En esta ocasión, se señala que cierta información de la técnica anterior en referencia al Acm 4E10-IgG3 era aparentemente errónea: Buchacher y col., (AIDS Research And Human Retroviruses 10(4), 1994, 359-369) publicaron resultados que demostraban la unión del Acm 4E10 a un epítipo C-terminal de gp41 en la posición de aminoácidos aa 824-830 (numeración referente a la cepa de VIH-1 BH10). Cuando se repitieron sus experimentos, no se pudo confirmar tal descubrimiento. Tampoco se observó la reacción cruzada con las proteínas del MHC de clase II notifi-

cadras en ese documento. No se encontró ninguna interacción con los péptidos relevantes 2047 y 2048 que contienen los aminoácidos EGTDRV1. A pesar de tal información equivocada de la técnica anterior que hace de 4E10-IgG3 simplemente uno de los varios anticuerpos poco interesantes sin propiedades anti-VIH prometedoras, se sometió al anticuerpo una vez más a ensayos de inhibición comparativos después de haber cambiado su fenotipo de IgG3 a IgG1 por expresión recombinante en células CHO. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de neutralización con la variante IgG1 fueron inesperadamente favorables y prometedores y superaron con creces las expectativas, como se ha señalado anteriormente.

El 4E10-IgG1 parece ser una poderosa herramienta, por ejemplo para la inmunización pasiva, ya que se demostró que el Acm 4E10-IgG1 neutralizaba también virus a los que no afectaba la neutralización de uno o ambos anticuerpos 2F5 y 2G12, y además porque no se pudo encontrar ningún aislado de VIH-1 que fuese insensible a la neutralización por una combinación de 2F5 y 4E10-IgG1.

La presente invención, en una forma de realización de la misma se refiere a una composición farmacéutica para la inhibición o prevención de la infección por VIH-1 de células de mamífero que comprende al menos un anticuerpo monoclonal neutralizante de VIH-1 que se une a una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aa 672-677 de la gp41 del aislado de TCLA HTVLIIMN, siendo el anticuerpo más preferido el Acm 4E10-IgG1. En otra forma de realización preferida, la composición farmacéutica comprende el Acm 4E10-IgG1 en combinación con al menos otro anticuerpo neutralizante anti-VIH, preferiblemente en combinación con al menos uno de los Acm 2F5 y 2G12.

En otra forma de realización más, la presente invención se refiere al uso del Acm 4E10, opcionalmente en su variante IgG1, para obtener o detectar sistemáticamente un anticuerpo idioitípico que sea reactivo con el paratopo de unión del Acm 4E10 y que imite el epítipo de 4E10 o una parte esencial del mismo, es decir, que imite un fragmento de gp41 de VIH-1 que comprenda una secuencia de aminoácidos que corresponda a los aa 672-677 de gp41 del aislado de TCLA HTVLIIMN.

Otras formas de realización preferidas de la presente invención se mencionan en las reivindicaciones dependientes.

Se citan los siguientes ejemplos a fin de que la invención descrita en el presente documento pueda comprenderse de un modo más completo. Los ejemplos son sólo para propósitos ilustrativos y no deben considerarse limitantes de la invención en ningún sentido.

Ejemplos

En los ejemplos a continuación se usaron los siguientes materiales y procedimientos 1 a 7:

a) Anticuerpos

Se han descrito la generación, producción y caracterización de los anticuerpos monoclonales humanos 4E10, 2F5, 2G12 y 3D6 anteriormente (D'Souza y col., J Infect Dispositivo 1997; 175: 1056-1062; Kunert y col., Biotechnol Bioeng 2000; 67: 97-103). Brevemente, se generaron hibridomas que producían anticuerpos mediante un procedimiento combinado de polietilenglicol/electrofusión. Se fusionó PBMC de donantes VOH-1 positivos asintomáticos con la línea celular de ratón de heteromioma humano CB-F7. En los sobrenadantes de los hibridomas se detectó sistemáticamente la producción de anticuerpos específicos del VIH y los clones positivos se analizaron adicionalmente mediante ELISA, inmunotransferencia de Western y ensayos de inmunofluorescencia. A fin de permitir la producción segura a gran escala y para cambiar el isotipo de 2F5 y 4E10 de IgG3 a IgG1, los anticuerpos se expresaron de forma recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) como IgG1 (k). Para los presentes estudios descritos en los subsiguientes ejemplos 1-7 se usaron las versiones IgG1 recombinantes de CHO de los anticuerpos 2F5 y 4E10.

4E10, 2F5 y 2G12 contenían regiones constantes idénticas y se diferenciaban únicamente en sus partes variables que se derivaron de los clones de hibridoma originales. 2G12 reconoce un epítipo sensible a la conformación sobre gp120, el Acm 2F5 reconoce el motivo ELDKWA sobre el ectodominio de gp41 y 4E10 un epítipo diferente sobre gp41. 3D6 reconoce un epítipo en el bucle inmunodominante de gp41 (aminoácidos GCSGKLICTTAVPWNAS) y sirvió como control no neutralizante en todos los ensayos sincitiales de inhibición.

El Acm humano IgG12 fue amablemente proporcionado por el Dr. Dennis Burton, The Stripps Research Institute. Su generación se describió en Burton y col., Science 1994; 266: 1024-1027. La IgG1 b12 reconoce un epítipo que se solapa con el dominio de unión a CD4 y se demostró que inhibe la interacción CD4/gp120. HIVIG fue preparado por NABI (Boca Raton, Florida, EE.UU.) y contenía inmunoglobulina policlonal purificada específica de VIH-1 derivada de múltiples pacientes VIH-1 positivos. La preparación que contenía IgG monomérica al 98% fue amablemente proporcionada por el Dr. John Mascola.

b) Células

La línea celular AMINOÁCIDO-2 para el ensayo de inhibición sincitial se obtuvo del programa de referencia de reactivos para el SIDA del NIH (proporcionada por M. Hershfield). Las células se pasaron dos veces por semana en medio de cultivo celular (MCC) que contenía RPMI-1640 (Biochrom, Berlín, Alemania) suplementado con FCS al 10% inactivado por calor y L-glutamina 4 mM.

Las PBMC para los ensayos de neutralización vírica se obtuvieron por centrifugación en gradiente de Ficoll a 400*g de sangre derivada de voluntarios VIH negativos. Las células fueron estimuladas con fitohemaglutinina (Sigma, San Luis, MO) en MCC suplementado con 20 U/ml de IL-2 y antibióticos (10 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin; Biochrom, Berlín, Alemania) durante dos días antes de su uso.

c) *Virus*

Los aislados primarios de VIH-1 9BR021/030, 92RW009/021, 97TH 14/21/24 y 9UG001/029/037 se obtuvieron a partir de la red de la OMS para el aislamiento y caracterización del VIH y fueron proporcionados por el Proyecto de reactivos para el SIDA de MRC. Anteriormente se aislaron los virus WYG, WRF, WHM, WRB y WSC a partir de pacientes austriacos con SIDA en fase terminal. Los aislados designados como S2/02, S2/03, S2/04, S2/05, S2/06, S2/08, S2/09 Y p6/71 se aislaron durante el ensayo clínico de fase I de 1999/2000 con 2F5 y 2G12 con voluntarios VIH-1 positivos. Los virus se cultivaron sobre PBMC estimuladas y probadas como sobrenadantes libres de células.

Los virus de TCLA HTLV-IIIB, HTLV-IIIMN y HTLV-IIIRF se derivaron de células H9 infectadas proporcionadas por la colección americana de cultivos tipo y el programa de investigación y reactivos de referencia para el SIDA del NIH; cl82 fue proporcionada por el Dr. E. M. Fenyö. Las soluciones madre se cultivaron y se valoraron sobre células AA-2. Se calculó la dosis infecciosa para cultivos tisulares del 50% (DICT50) según el procedimiento de Reed y Muench (Reed LJ y Muench H, AM J Higiene 1938; 27: 493-497).

Ejemplo 1

Mapeo de epítomos por ELISA

Para el mapeo del epítipo de 4E10 se derivaron treinta y cuatro péptidos solapantes de gp41 de HTLV-IIIMN (aa 501-856, tabla 1) producidos por AnaSpec, Incorporated a partir del el programa de investigación y reactivos de referencia para el SIDA (números 2015-2049). La mayoría de estos péptidos tenían veinte aminoácidos de longitud con diez solapamientos de aminoácidos entre péptidos secuenciales. El péptido GGGLELDKWASL se sintetizó por cuenta propia.

El péptido recombinante truncado MN de gp41 de *E. coli* fue proporcionado por el Dr. Raina a través de las instalaciones centralizadas del NIBSC para reactivos para el SIDA. La gp160IIIB recombinante de Vaccinia fue un regalo de Immuno-AG Austria.

Se recubrieron durante toda la noche placas de microvaloración (Nunc Maxisorp, Roskilde, Dinamarca) a +4°C con los péptidos sintéticos gp41MN o gp160IIIB a una concentración constante de 1 µg/ml o diluciones seriadas, partiendo de 10 µg/ml en tampón de carbonato sódico 0,1 M. Las placas se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,1% y se bloquearon con leche desnatada al 2% durante 2 horas a 37°C. Después del lavado, las diluciones seriadas (partiendo de 500 ng/ml) o las concentraciones constantes (100 ng/ml) de 4E10 o 2F5 se incubaron durante una hora. Las placas se lavaron e incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG(g) conjugado con peroxidasa de rábano (zymed, san Francisco, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se revelaron con solución de tinción de diclorhidrato de 1,2-o-fenilendiamina (OPD; Sigma, San Luis, MO) que contenía H₂O₂ al 0,03%. Después de detener la reacción con H₂SO₄ 2,5 N, se midió la densidad óptica (DO) a 492/620 nm.

Para los estudios de competencia, se probaron todos los péptidos solapantes de gp41 MN, GGGLELDKWASL y gp41 MN. Se incubaron previamente concentraciones constantes de 4E10 (250 ng/ml) con diluciones seriadas de péptidos (partiendo de 50 µg/ml para los péptidos sintéticos y 5 µg/ml para gp41) durante 2 horas a 37°C antes de la adición a las placas recubiertas con péptido 2031 o gp41 (1 µg/ml). Análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal y citometría de flujo. Para la microscopía confocal, se permitió que PBMC infectadas con virus VIH-1 primarios (S2/02, S2/04, S2/08) se adhiriesen a portaobjetos (Biorad, Munich, Alemania) durante 1 hora a 37°C. Como controles negativos sirvieron PBMC no infectadas no estimuladas y PBMC estimuladas con mitógeno del mismo donante. Los portaobjetos se lavaron con PBS y se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS durante 20 minutos. Se aplicaron los anticuerpos 4E10, 2F5, 2G12 y HIVIG a concentraciones de 100 µg/ml y se incubaron durante 1 hora a +4°C. Las células se lavaron con PBS/leche desnatada y se incubaron con anticuerpo policlonal de cabra anti IgG(g) humana marcado (Sigma, San Luis, MO) durante una hora. Después de lavar intensamente con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído (3%) durante 20 minutos y se lavaron a continuación con PBS. La señal fluorescente se visualizó en un microscopio confocal MRC 600 de Biorad.

De forma alternativa, se realizaron los mismos experimentos con fijación con paraformaldehído antes de las etapas de tinción de las PBMC e incubación a 37°C. Para análisis de citometría de flujo, las PBMC infectadas con VIH-1 (aislados S2/02, S2/04), no infectadas estimuladas con PHA-P y no estimuladas se lavaron y bloquearon con PBS que contenía FCS al 10% durante 30 minutos a +4°C. Las PBMC se incubaron con 4E10, 2F5 y HIVIG (100 µg/ml) durante una hora en hielo. Después de lavarlas con PBS/FCS, las células se incubaron con anticuerpo policlonal de cabra anti IgG(g) humana marcado con FITC durante 1 hora, de nuevo en hielo. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente antes de su análisis en un FACS-Vantage (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Ensayo de inhibición sincitial

El ensayo de inhibición sincitial se avaluó usando células AA-2 como línea celular indicadora con formación de sincitio como lectura como se ha descrito previamente (Purtscher y col., AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 1651-1658). Brevemente, se incubaron diluciones seriadas de anticuerpos en MCC que contenía polibreno (5 µg/ml, Sigma, San Luis, MO) con virus de 102-103 TCID₅₀/ml durante 1 hora a 37°C antes de añadir células AA-2. Las células se incubaron durante 5 días antes de la evaluación de la formación de sincitio. Los experimentos se realizaron con 4-8 réplicas por cada etapa de dilución. La presencia de al menos un sincitio por pocillo se consideró como una indicación de la infección por VIH-1. La concentración inhibidora del 50% (CI₅₀) se calculó según el procedimiento de Reed y Muench, AM J Higiene 1938; 27: 493-497. Los experimentos se realizaron con 2F5, 2G12 y 4E10. Todos los ensayos incluyeron una valoración del virus del inóculo para confirmar el valor infeccioso. En experimentos alternativos se omitió la etapa de incubación previa del anticuerpo y el virus.

Ensayo de neutralización

La actividad neutralizante de los Acm humanos 4E10 (=4E10-IgG1), 2F5 (2F5-IgG1), 2G12 e IgG1b12 se determinó en un ensayo de neutralización basado en PBMC como se ha descrito previamente (Purtscher y col., AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 1651-1658). Se incubaron diluciones seriadas de los anticuerpos con virus durante 1 hora a 37°C antes de la adición de PBMC y la incubación adicional durante 7 días. Los experimentos se realizaron con 4 réplicas por cada etapa de dilución. El crecimiento del virus se midió mediante un ELISA sensible a p24 (Steindl y col., J Immunol Methods 1998; 217: 143-151) en el momento del fin del ensayo.

Se calcularon las proporciones de producción de antígeno p24 en cultivos que contenían Acm a producción de antígeno p24 en cultivos de control, teniendo en cuenta el p24 introducido y se determinaron las concentraciones de Acm (µg/ml) que provocaban un 50% de inhibición mediante análisis de regresión lineal. Cada ensayo incluía una valoración de virus para determinar la DICT₅₀ real. Se consideró que las pruebas eran válidas cuando las valoraciones víricas estaban entre 102-103 DICT₅₀ y la replicación máxima resultó en concentraciones de p24 cinco veces mayores que el p24 introducido.

Determinación de la sinergia de combinaciones de Acm

Se determinó el cálculo de los efectos neutralizantes sinérgicos de Acm en combinaciones según el procedimiento de Chou-Talalay (Chou TC y Talalay, Adv Enzyme Regul 1984; 22:27-55). Brevemente, la cantidad de Acm solos necesaria para obtener el 50% de inhibición se comparó con las concentraciones requeridas cuando se usó una combinación de Acm. El índice de combinación (IC) se calculó basándose en la ecuación $IC = (D1)/(Dx)1 + (D2)/(Dx)2$. (Dx)₁ y (Dx)₂ son las concentraciones de Acm1 y Acm2 solos requeridas para alcanzar el 50% de neutralización mientras que (D1) y (D2) son las dosis de Acm1 o Ac2 cuando se usan en combinación. IC<1 indica sinergia, IC=1 indica efectos aditivos y C>1, antagonismo.

Resultados

Para determinar la región de unión de 4E10, se probó la reactividad de treinta y cuatro (34) péptidos gp41 MN con 4E10 mediante ELISA. El péptido GGGLELDKWASL que comprendía el epítipo mínimo 2F5 gp41 se usó como control negativo, gp41 MN y gp160IIB sirvieron como controles positivos. Se probó 2F5 en paralelo para explorar la posibilidad de que ambos anticuerpos reconociesen el mismo epítipo. 4E10 se unió al péptido 2031, gp160 (figura 1 y tabla 1) y gp41 de forma dependiente de la dosis. Ningún otro péptido mostró una reactividad significativa con 4E10. 2F5 se unió a los mismos péptidos y adicionalmente al péptido 2030 (figura 1 y tabla 1) y al péptido GGGLELDKWASL, todos los cuales contenían la secuencia ELDKWA.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 274 100 T3

TABLA 1

Secuencias de aminoácidos de péptidos gp41MN del VIH-1 usadas para los estudios de ELISA de unión de 4E10 y 2F5.^A

Secuencia	Código	Región	unión a 4E10	unión a 2F5
n.p.	2015-1018	501-650	-	-
SLIYSLLEKSQTQQEKNEQE	2029	641-660	-	-
QTQQEKNEQEELLELDKWASL	2030	651-670	-	+
LLELDKWASLWNWFDITNWL	2031	661-680	+	+
DITNWLWYIKI	2032	675-685	-	-
n.p.	2034-2049	696-856	-	-
^A La unión de 4E10 y 2F5 a péptidos sintéticos recubiertos en placas de ELISA se detectó con anticuerpo de cabra anti IgG(g) humana n.p. no presentada				

Los estudios de competencia realizados con todos los péptido sintéticos gp41MN y gp41 confirmaron que únicamente el péptido 2031 y gp41 (no se probó gp160) reaccionaban con 4E10. La incubación previa de cantidades constantes de 4E10 con diluciones seriadas de péptido 2031 y gp41 sólo dieron como resultado una inhibición dependiente de la dosis de la unión del Acm 4E10 al gp41 (figura 3A) o al péptido 2031 (figura 3B). Ningún otro péptido pudo inhibir la unión de 4E10.

A partir de los resultados anteriores se concluyó que el epítipo mínimo de unión (epítipo central) de 4E10 estaba enteramente presente en el péptido 2031 y está localizado a continuación del epítipo ELDKWAS de 2F5 y dentro de la secuencia de aa LWNWFDITNWL (posiciones de aa 670-680 de gp41; numeración según el aislado de TCLA HTLV-III MN). Un mapeo más detallado usando péptidos más pequeños reveló un epítipo central de seis aminoácidos que comprendía la secuencia de aa NWFIDT (aa 672-677 de gp41 de HTLVIII MN).

Ejemplo 2

Análisis de inmunofluorescencia de las características de unión de 4E10

Para estudiar la interacción de 4E10 con los antígenos del VIH.1 presentes en la superficie de PBMC infectadas y también una posible reactividad cruzada con el MHC de clase II, que se había notificado previamente (Buchacher y col., véase anteriormente), se realizaron estudios de unión de 4E10 a PBMC no estimuladas y estimuladas con PHA-P, VIH-1 negativas así como infectadas por VIH-1. La unión de 4E10 se comparó con la de 2F5, 2G12 y HIVIG por inmunofluorescencia indirecta usando microscopía confocal y citometría de flujo.

Sólo se detectó una unión significativa a células infectadas en las que 2G12 y HIVIG se unieron fuertemente y 4E10 y 2F5 sólo mostraron una reactividad débil (no se muestran los datos). 4E10 tampoco se unió de forma más intensa a PBMC de lo que lo hicieron 2F5, 2G12 y HIVIG. No se observó ninguna diferencia entre los resultados obtenidos para las células nativas teñidas a +4°C comparadas con células previamente fijadas a 37°C.

Ejemplo 3

Ensayo de inhibición sincitial con cepas de VIH-1 adaptadas a líneas de células T (TCLA)

La capacidad del anticuerpo monoclonal humano 4E10 (=4E10-IgG1) de inhibir la formación de sincitios por los aislados TCLA HTLVIIIB, HTLVIIIRF, HTLVIIIMN y cl82 en células AA-2 se comparó con la capacidad correspondiente de los Acm 2F5 y 2G12. El Acm 2G12 reconoce un epítipo sensible a la conformación, dependiente de glucosilación sobre gp120 no relacionado con los bucles V1, V2 y V3 del sitio de unión a CD4 (Trkola y col., J Virol

ES 2 274 100 T3

1996; 70: 1100-1108). 4E10 y 2F5 inhibieron la formación de sincitio para los cuatro virus, mientras que 2G12 no neutralizó a HTLV-III MN (tabla 2).

TABLA 2

Ensayo de inhibición sincitial^a con los Acm 4E10, 2F5 y 2G12 contra virus adap

Aislado	Clado (gag/env)	Correceptor (fenotipo)	CI ₅₀ (µg/ml) ^b			
			4E10	2F5	2G12	3D6
IIB	B/B	X4 (IS)	1,0	0,3	0,4	>50
MN	B/B	X4 (IS)	0,3	0,9	>50	>50
RF	B/B	X4 (IS)	12,5	4,4	2,4	>50
cl82	B/B	X4 (IS)	6,3	0,3	3,7	>50
^a Los ensayos se realizaron sobre células AA-2 usando la presencia o ausencia de formación de sincitio como lectura. ^b Concentración de anticuerpo que inhibió el 50% de la replicación vírica. IS Inductora de sincitio						

El 3D6, un Acm que reconoce un epítipo en el bucle inmunodominante de gp41 (Buchacher y col., véase anteriormente) sirvió como un control no neutralizante y no fue capaz de inhibir la formación de sincitio. Las concentraciones inhibitoras del 50% de 4E10 oscilaron entre 0,3 µg/ml para la cepa MN hasta 12,5 µg/ml para la cepa RF. 2F5 y 2G12 neutralizaron las cepas de HTLV-III MN a concentraciones comparablemente bajas, salvo que 2G12 no neutralizó el virus HTLV-III MN. 4E10 fue el Acm más potente frente a HTLV-III MN, 2F5 lo fue frente a HTLV-III B y cl82 (0,3 µg/ml) mientras que 2G12 neutralizó HTLV-III RF a concentraciones más bajas que los dos otros Acm (2,4 µg/ml).

Ejemplo 4

Influencia de la incubación previa de virus y Acm sobre la inhibición de sincitios

Para determinar la influencia de la incubación previa de virus con anticuerpo antes de la adición de células diana, se realizaron ensayos alternativamente sin la etapa de la incubación previa. Se añadieron virus (HTLV-III RF) y Acm (4E10, 2F5, 2G12) simultáneamente a células AA-2. Para 4E10 (-IgG1) y 2F5 (-IgG1), los resultados no fueron diferentes con y sin incubación previa, mientras que para 2G12 se observó un increíble aumento del 300% después de la etapa de incubación previa de una hora.

Ejemplo 5

Neutralización de aislados de VIH-1 primarios

A continuación, se comparó la actividad neutralizante del Acm 4E10 (-IgG1) con la actividad correspondiente de 2F5, 2G12 e IgG1b12 frente un panel de aislados primarios de diferentes clados en un ensayo de neutralización basado en PBMC. IgG1b12 se une a un epítipo discontinuo que se solapa con el dominio de unión a CD4 de gp120 (véase Burton y col., Science 1994; 266: 1024-1027). Las concentraciones de Acm para las que se alcanzó el 50% de neutralización se muestran en la tabla 3 (los valores se obtuvieron a partir de dos experimentos independientes).

ES 2 274 100 T3

TABLA 3

Neutralización de aislados de VIH-1 primarios por Acm 4E10, 2F5, 2G12 e IgG1b12a

Aislado	Clado (gag/env)	Correceptor (fenotipo)	CI ₅₀ (µg/ml) ^b			
			4E10	2F5	2G12	IgG1b12
92RW009	C/A	R5X4 (IS)	0,6	0,3	0,1	n.d.
92RW021	-/A	R5 (-)	0,3	0,7	0,1	n.d.
92UG029	A/A	X4 (IS)	43,4	4,9	<0,1	n.d.
92UG037	A/A	R5 (NIS)	0,4	0,7	0,1	n.d.
92TH014	B/B	R5 (NIS)	1,0	2,6	0,1	n.d.
92BR021	B/B	R5 (NIS)	2,7	2,7	>50	n.d.
92BR030	B/B	R5 (NIS)	0,5	5,0	0,5	n.d.
92UG001	D/D	R5X4 (IS)	4,8	6,9	>50	n.d.
92TH021	-/E	R5 (NIS)	0,5	1,1	>50	n.d.
92TH024	A/E	R5 (-)	3,0	<0,1	>50	n.d.
WYG	n.d.	X4 (IS)	>50	0,8	0,5	n.d.
WRF	n.d.	X4 (IS)	>50	4,7	4,6	n.d.
WHM	n.d.	X4 (IS)	>50	2,1	0,6	n.d.
WRB	n.d.	X4 (IS)	>50	5,4	1,5	n.d.
WSC	n.d.	X4 (IS)	30,0	>50	0,4	n.d.
S2/02	n.d.	R5 (NIS)	10,0	8,0	>50	26,6
S2/03	n.d.	R5 (NIS)	0,3	0,3	>50	>50
S2/04	n.d.	R5 (NIS)	2,5	0,5	>50	n.d.
S2/05	n.d.	R5 (NIS)	<0,1	0,2	<0,1	0,1
S2/06	n.d.	R5 (NIS)	1,2	3,5	>50	33,2
S2/08	n.d.	R5 (NIS)	<0,1	1,5	>50	2,0
S2/09	n.d.	R5X4 (IS)	<0,1	>50	<0,1	<0,1

^a Los ensayos se realizaron sobre PBMC estimuladas con mitógeno usando p24 como marcador de replicación.

^b Concentración de anticuerpo que inhibió el 50% de la replicación vírica.

n.d. no determinada

IS Inductora de sincitio

NIS No inductora de sincitio

ES 2 274 100 T3

4E10 neutralizó 18/22, 2F5 20/22, 2G12 13/22 e IgG1b12 5/6 aislados probados a concentraciones por debajo de 50 µg/ml. Por ejemplo, 4E10 fue tan activo como 2G12 contra el aislado S2/05 y más activo que 2F5 e IgG1b12 (figura 2). Las concentraciones medias necesarias para alcanzar una inhibición del 50% de la replicación fueron de 5,7 (4E10), 2,6 (2F5), 0,7 (2G12) y 12,4 µg/ml (IgG1b12) para los virus neutralizados. Ningún virus fue resistente a los cuatro anticuerpos. Además, cada virus fue neutralizado por al menos uno de los anticuerpos anti-gp41 4E10 o 2F5, en los que 16/22 aislados fueron neutralizados por ambos Acm, 2/22 únicamente por 4E10 y 4/22 únicamente por 2F5.

Ejemplo 6

Comparación de la actividad de neutralización de Acm 4E10-IgG3 de hibridoma y Acm recombinante 4E10-IgG1 de CHO

Se llevaron a cabo ensayos de neutralización basados en PBMC con aislados primarios de VIH-1 (véase el ejemplo 5).

Aislado	Clado	90% de Neutralización IgG3	90% de Neutralización IgG1	aumento (x-veces)
92UG037	A	3,08	0,67	4,6
92TH024	E	4,48	0,31	14,5
92RW009	A	8,64	2,46	3,3
92BR021	B	8,80	2,14	4,1

Los resultados demuestran de forma impresionante el notable aumento en la eficacia de neutralización del Acm 4E10-IgG1 sobre el Acm conocido 4E10-IgG3.

Ejemplo 7

Aplicación combinada de los Acm 4E10 y 2F5

Puesto que 4E10 y 2F5 reconocen epítopos adyacentes, se estudió la posible interacción inhibidora de 2F5 y 4E10 en la neutralización de virus primarios para 5 virus primarios diferentes (S2/02, S2/03, S2/04, S2/06 y S2/08) por comparación de preparaciones que contenían anticuerpos 2F5 o 4E10 con una preparación que contenía una combinación de los dos anticuerpos (en proporción 1:1). La combinación de 2F5 (-IgG1) y 4E10 (-IgG1) dio como resultado un ligero efecto sinérgico o aditivo ($IC_{50} \leq 1$) en todos los experimentos, no se detectó un efecto antagonista en ninguno de los experimentos. Los resultados de un experimento adicional con el aislado primario P6/71, en el que también estaban incluidos 2G12 e IgG1b12, se muestran en las figuras 4A, 4B y 4C. Los índices de combinación (IC_{50}) para este experimento fueron 0,64, 0,23 y 0,87 para la combinación de 4E10 con 2F5, 2G12 e IgG1b12, respectivamente e indican también que 2G12 e IgG1b12 no antagonizan con 4E10 sino que más bien muestran efectos aditivos si no sinérgicos.

ES 2 274 100 T3

Asignación de secuencias de aminoácidos:

5	ID	SEC	N°:	NWFDIT
	01			
10	ID	SEC	N°:	NWFNIT
	02			
15	ID	SEC	N°:	SWFGIT
	03			
20	ID	SEC	N°:	TWFGIT
	04			
25	ID	SEC	N°:	NWFSIT
	05			
30	ID	SEC	N°:	LWNWFDITNWL
	06			
35	ID	SEC	N°:	LLELDKWASLWNWFDITNWL
	07			
40	ID	SEC	N°:	EQELLELDKWASLWNWFDITNWL
	08			L
45	ID	SEC	N°:	DITNWLWYIKI
	09			
50	ID	SEC	N°:	EGTDRVI
	10			
55	ID	SEC	N°:	LDKWA
	11			
60	ID	SEC	N°:	ELDKWA
	12			
65	ID	SEC	N°:	ELDKWAS
	13			
	ID	SEC	N°:	GGGLELDKWASL
	14			
	ID	SEC	N°:	QTQQEKNEQELLELDKWASL
	15			
	ID	SEC	N°:	GCSGKLICTTAVPWNAS
	16			
	ID	SEC	N°:	SLIYSLLEKSQTQQEKNEOE
	17			

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal neutralizante de VIH-1 distinto del Acm 4E10 IgG3 (Nº de acceso ECACC 90091703), en el que el anticuerpo se une a una secuencia de aminoácidos idéntica o correspondiente a los aa 672 - 677 (NWFDIT) de gp41 del aislado TCLA HTVLIIMN y es capaz de neutralizar mutantes de VIH-1 que son insensibles a la neutralización por el Acm 2F5 (Nº de acceso ECACC 90091704) y/o el Acm 2G12 (Nº de acceso ECACC 93091517), **caracterizado** porque es el Acm 4E10 IgG1 (Nº de acceso ECACC 01110665).
2. Una composición farmacéutica para inhibir o prevenir la infección por VIH-1 de células de mamífero, **caracterizada** porque comprende un anticuerpo según la reivindicación 1.
3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2, **caracterizada** porque comprende al menos otro anticuerpo neutralizante anti VIH-1.
4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizada** porque comprende al menos uno de los Acm 2F5 y 2G12.
5. Uso del Acm 4E10 IgG1 (Nº de acceso ECACC 01110665) para la fabricación de una composición farmacéutica contra la infección por VIH-1.
6. Uso según la reivindicación 5 para inhibir o prevenir la infección de células de mamífero por cepas de VIH-1 que son insensibles frente a la neutralización por uno o ambos Acm 2F5 y 2G12.
7. Uso del Acm 4E10 IgG1 (Nº de acceso ECACC 01110665) para obtener o detectar sistemáticamente un péptido, particularmente un anticuerpo idiotípico que reacciona con el parátipo de unión 4E10 del Acm 4E10-IgG1.
8. Uso del Acm 4E10 IgG1 (Nº de acceso ECACC 01110665) según la reivindicación 7, en el que dicho péptido imita a un fragmento de gp41 de VIH-1 que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica o correspondiente a los aa 672 - 677 (NWFDIT) de gp41 del aislado TCLA HTVLIIMN.
9. Una composición farmacéutica para la inmunización pasiva de un receptor mamífero frente a la infección por VIH-1 **caracterizada** porque comprende al menos un anticuerpo neutralizante de VIH-1 definido en la reivindicación 1.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 9, **caracterizada** porque comprende al menos otro anticuerpo neutralizante de VIH-1 seleccionado del grupo constituido por el Acm 2F5 (Nº de acceso ECACC 90091704) y el Acm 2G12 (Nº de acceso ECACC 93091517).

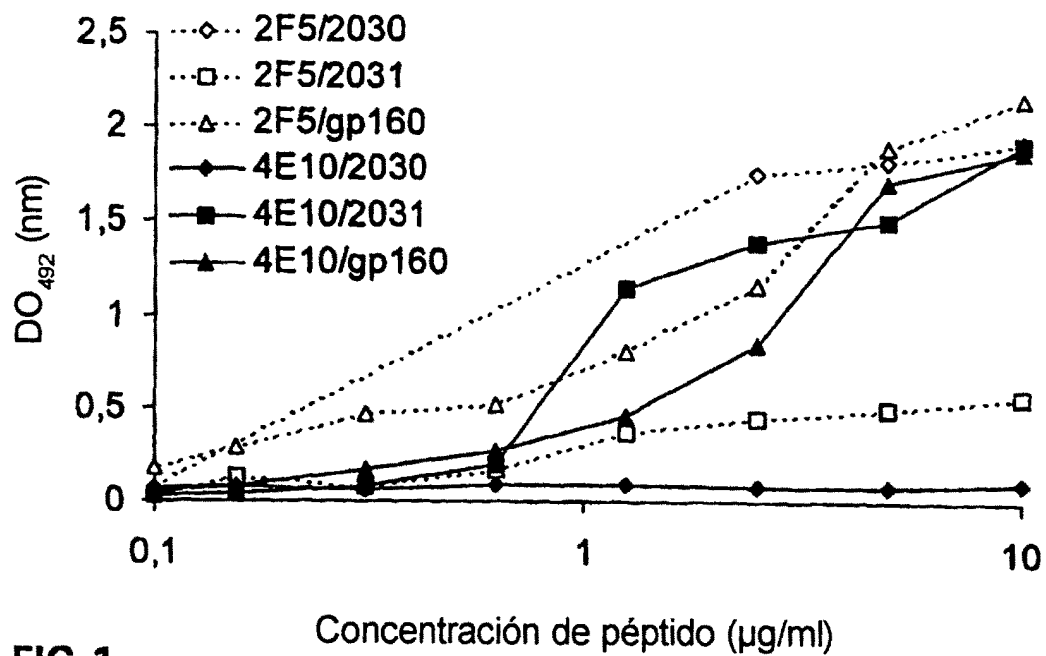


FIG. 1

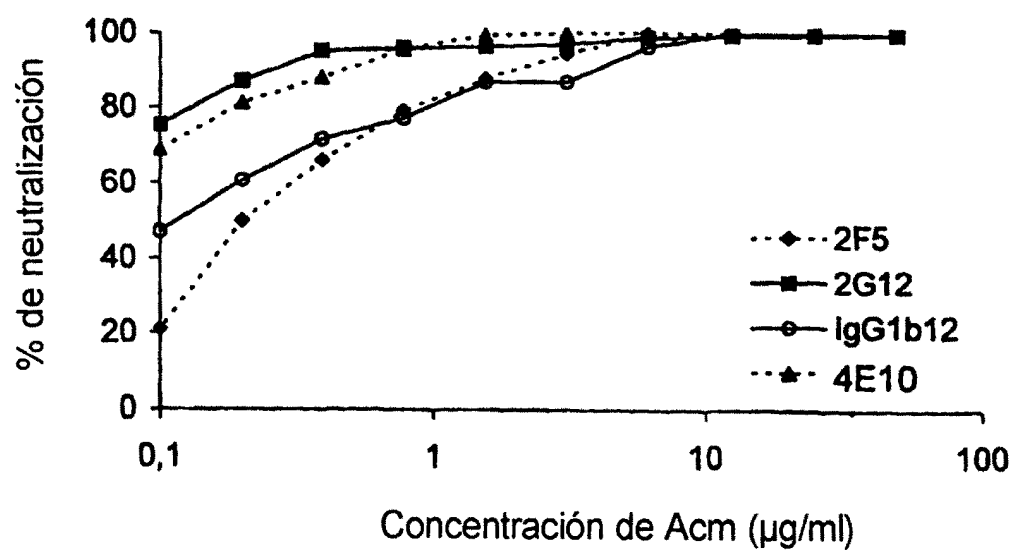


FIG. 2

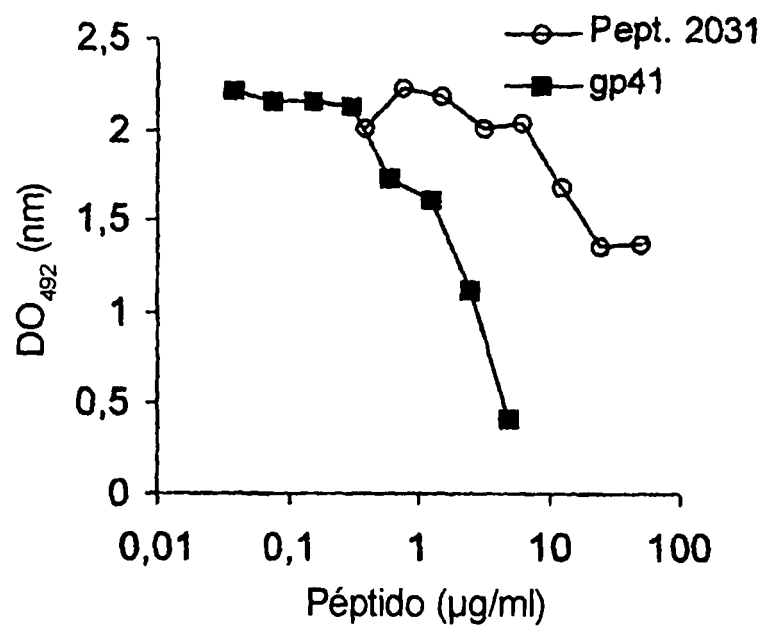


FIG. 3A

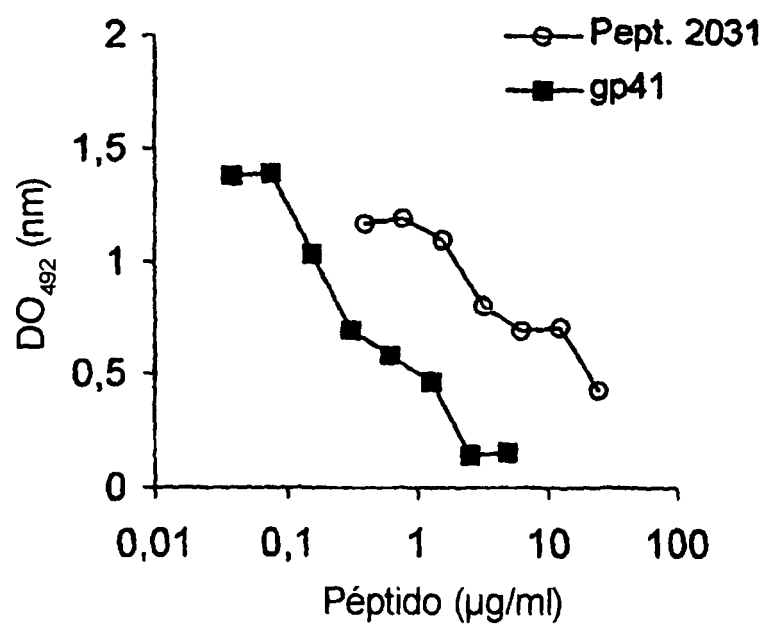


FIG. 3B

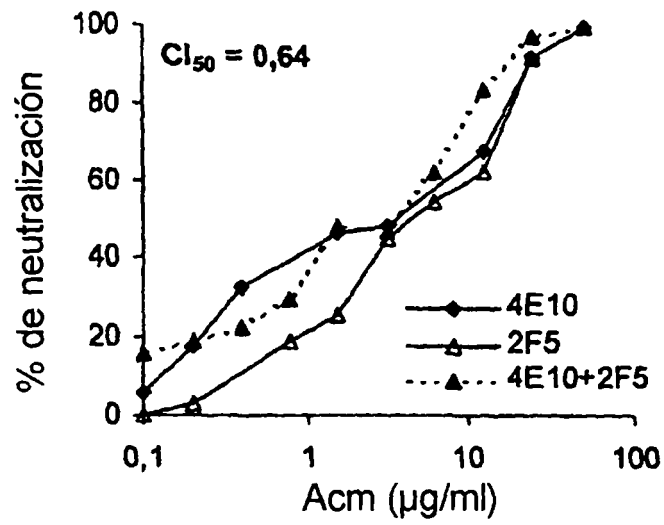


FIG. 4A

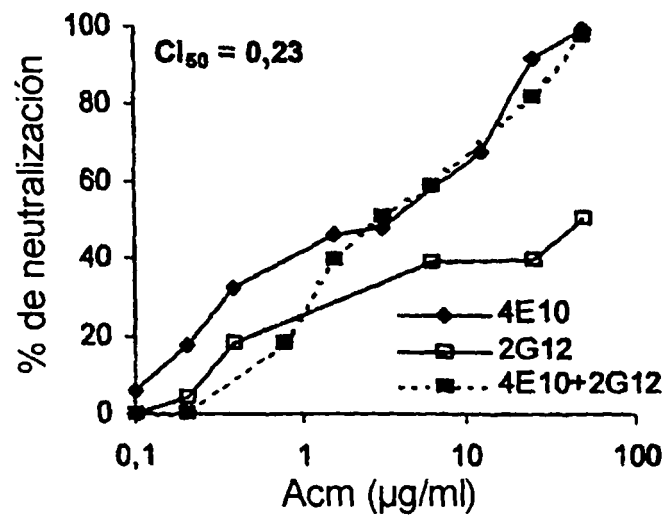


FIG. 4B

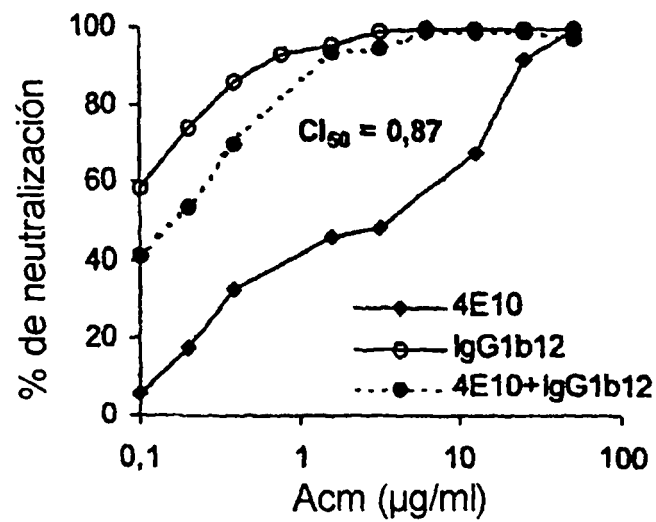


FIG. 4C

ES 2 274 100 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> polymun scientific Immunbiologische Forschung GMBH
Stiegler, Gabriela
5 Kunert, Renate
Katinger, Hermann

<120> péptidos miméticos de un epítipo críptico de gp41 del VIH-1

<130> BEP-5074-PC

10 <150> Us60/318.091

<151> Us 60/318.091

<160> 17

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 1

Asn Trp Phe Asp Ile Thr
1 5

25

<210> 2

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 2

Asn Trp Phe Asn Ile Thr
1 5

35

<210> 3

40 <211> 6

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 3

45 Ser Trp Phe Gly Ile Thr
1 5

<210> 4

50 <211> 6

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

55 <400> 4

Thr Trp Phe Gly Ile Thr
1 5

60

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

65 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

ES 2 274 100 T3

<400> 5
 Asn Trp Phe Ser Thr
 1 5
 5
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 6
 Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu
 1 5 10
 15
 <210> 7
 <211> 20
 20 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 7
 25 Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile
 1 5 10 15
 Thr Asn Trp Leu
 20
 30
 <210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 35 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 8
 Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
 1 5 10 15
 Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu
 20
 40
 45 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 50 <400> 9
 Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
 1 5 10
 55
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 60 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 10
 Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile
 1 5
 65
 <210> 11

ES 2 274 100 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 5 <400> 11
 Leu Asp Lys Trp Ala
 1 5
 10 <210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 15 <400> 12
 Glu Leu Asp Lys Trp Ala
 1 5
 20
 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 13
 Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 30 1 5
 <210> 14
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <400> 14
 40 Gly Gly Gly Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
 1 5 10
 <210> 15
 45 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 15
 50 Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys
 1 5 10 15
 Trp Ala Ser Leu
 20
 55
 <210> 16
 <211> 17
 60 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 16
 65 Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala
 1 5 10 15
 Ser

ES 2 274 100 T3

	<210> 17															
	<211> 20															
	<212> PRT															
5	<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1															
	<400> 17															
10	Ser	Leu	Ile	Tyr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Gln	Gln	Glu	Lys
	1				5					10					15	
	Asn	Glu	Gln	Glu												
					20											
15																
20																
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																