

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 834**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/15 (2006.01)
C07K 14/155 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2019 PCT/US2019/063619**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2020 WO20117590**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2019 E 19893005 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3891170**

54 Título: **Inmunógenos vacunales contra el VIH**

30 Prioridad:

04.12.2018 US 201862775192 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.01.2025

73 Titular/es:

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (50.00%)
1230 York Avenue
New York, NY 10065, US y
CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.00%)

72 Inventor/es:

NUSSENZWEIG, MICHEL;
BJORKMAN, PAMELA, J.;
ESCOLANO, AMELIA y
GRISTICK, HARRY

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 834 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunógenos vacunales contra el VIH

5 Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de conformidad con 35 U.S.C. §119(e) a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos núm. 62/775,192, presentada el 4 de diciembre de 2018.

10 Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se ha presentado por vía electrónica en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 14 de noviembre de 2019, se llama 070413_20403_SL.txt y tiene un tamaño de 178 838 Kbytes.

15 Campo de la invención

Esta descripción se refiere a polipéptidos inmunogénicos, y específicamente a polipéptidos inmunogénicos que pueden estimular una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

20 Antecedentes de la invención

La clonación de anticuerpos de células individuales de donantes humanos infectados por VIH-1 reveló que los anticuerpos anti-VIH-1 ampliamente neutralizantes (bNAb) son inusuales porque están altamente mutados somáticamente. Además, el alto grado de mutaciones somáticas es esencial para la unión a Env nativa del VIH-1 y para la actividad neutralizante de los bNAb. La acumulación de un gran número de mutaciones sugiere que los bNAb evolucionan en respuesta a rondas iterativas de hipermutación somática y selección en centros germinales (GC). Como lo revelan estudios prospectivos en seres humanos, los bNAb lo hacen en respuesta a variantes de escape viral que surgen de la presión de los anticuerpos. En conjunto, estas observaciones sugieren que la vacunación para provocar bNAb requiere una serie de inmunógenos secuenciales lo que inicia con un inmunógeno que induce la expansión de los linfocitos B que portan precursores de bNAb de la línea germinal.

La idea de que la inmunización secuencial puede guiar el desarrollo de bNAb se confirmó mediante experimentos en ratones genéticamente modificados que portan los precursores de la línea germinal inferidos (iGL) de los bNAb humanos. Sin embargo, los inmunógenos sensibilizantes usados para iniciar la respuesta no lograron activar ni expandir las células B que expresan precursores inferidos de bNAb en animales con repertorios de anticuerpos policlonales. De hecho, los iGL de casi todos los bNAb no logran unirse a inmunógenos del VIH-1 similares a los nativos ni neutralizar las cepas del VIH-1. Por lo tanto, un objetivo fundamental del desarrollo de vacunas contra el VIH-1 ha sido diseñar inmunógenos que recluten células B que expresen precursores de bNAb en reacciones de GC en animales con repertorios policlonales, incluidos primates.

Con este fin, el enfoque dirigido a la línea germinal para el diseño de inmunógenos se ha enfocado en producir inmunógenos que se unen a precursores de bNAb específicos con alta afinidad, donde el fundamento es que el reclutamiento de células B hacia los GC depende en parte de la afinidad del receptor por el antígeno. Sin embargo, esta metodología limita eficazmente el repertorio de células B reclutadas cualitativa y cuantitativamente. Además, no tiene en cuenta el hallazgo de que cada GC puede alojar múltiples células B fundadoras diferentes con un amplio intervalo de afinidades y que la entrada a GC está limitada por la competencia y no por la afinidad absoluta. Una alternativa es diseñar inmunógenos que mejoren la disponibilidad del epítipo objetivo y al mismo tiempo enmascaren sitios inespecíficos. Este enfoque difiere del direccionamiento a la línea germinal en que es independiente de la afinidad de un anticuerpo de la línea germinal específico por el antígeno. En cambio, su objetivo es reclutar y expandir un grupo diverso de precursores específicos del sitio objetivo. Ambos enfoques tienen como objetivo producir clones expandidos de células B que luego puedan reforzarse con inmunógenos secuenciales para guiar la producción de bNAb. Hasta la fecha, ninguno de estos métodos ha demostrado expandir clones de células B específicos para un objetivo de VIH-1 deseado en animales de tipo salvaje.

En consecuencia, sigue existiendo una necesidad apremiante de inmunógenos que pueden estimular una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo, por medio de la expansión de clones de células B específicos para un objetivo de VIH-1 deseado.

60 El documento WO 2017/165674 se refiere a inmunógenos manipulados genéticamente para inducir anticuerpos ampliamente neutralizantes (bnAb) contra la región de la envoltura del VIH-1 V3. Se ha demostrado actividad inmunogénica in vivo en ratones.

65 Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido aislado de acuerdo con la

reivindicación 1 en la presente descripción.

Varias modalidades descritas en este documento abordan las necesidades no satisfechas mencionadas anteriormente y/u otras necesidades al proporcionar inmunógenos del VIH y usos de los mismos.

5 En un aspecto, la descripción se refiere a un inmunógeno para estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta inmunitaria contra el VIH) de un sujeto que lo necesita. El inmunógeno comprende un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 11 y 13.

10 El inmunógeno mencionado anteriormente se une a un anticuerpo ampliamente neutralizante con una afinidad (por ejemplo, KD de aproximadamente 50 μ M o menos). Ejemplos de anticuerpos ampliamente neutralizantes pueden incluir los anticuerpos ampliamente neutralizantes 10-1074 y PGT121.

15 También están dentro del alcance de esta invención un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido descrito anteriormente, un vector que comprende el ácido nucleico y una célula huésped que comprende el ácido nucleico. La célula huésped puede usarse en un método para producir el polipéptido. El método incluye cultivar la célula huésped en un medio en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido codificado por el ácido nucleico y purificar el polipéptido a partir de la célula cultivada o del medio de la célula.

20 En otro aspecto, esta descripción proporciona un complejo proteico que comprende al menos un polipéptido descrito anteriormente y una partícula de virus que comprende al menos un polipéptido descrito anteriormente.

25 En otro aspecto, esta descripción proporciona una composición inmunogénica. La composición inmunogénica incluye (i) el polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente; y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto, esta descripción proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende el polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula similar a virus (VLP) descritos anteriormente, o una de sus combinaciones.

35 En otro aspecto, esta descripción proporciona un método para tratar o prevenir la infección por VIH en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente, o una de sus combinaciones. En algunas modalidades, el método también puede incluir administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antiviral.

40 En otro aspecto, esta descripción proporciona el uso del polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente, o una de sus combinaciones en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la infección por VIH en un sujeto.

45 En otro aspecto, esta descripción proporciona un método *in vitro* para detectar o aislar un anticuerpo de unión al VIH-1 en un sujeto infectado con VIH-1. El método incluye: (i) proporcionar el polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente, o una de sus combinaciones; (ii) poner en contacto la composición inmunogénica con una cantidad de fluido corporal del sujeto; y (iii) detectar la unión del anticuerpo de unión al VIH-1 al polipéptido, de esta manera se detecta o aísla el anticuerpo de unión al VIH-1 en un sujeto.

50 En otro aspecto más, esta descripción proporciona un kit para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. El kit incluye (i) una o más dosis unitarias del polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente; (ii) instrucciones para administrar el polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus; y (iii) opcionalmente un adyuvante.

55 Esta descripción también proporciona un anticuerpo anti-VIH aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región determinante de la complementariedad que tiene una secuencia que es al menos 75 % idéntica a una secuencia polipeptídica enumerada en las Tablas 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11.

60 También está dentro del alcance de esta descripción una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-VIH aislado, o porción de unión a antígeno del mismo como se describe, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

65 En otro aspecto, esta descripción proporciona un método para prevenir o tratar una infección por VIH o una enfermedad relacionada con el VIH que comprende las etapas de: (i) identificar a un paciente que necesita dicha prevención o tratamiento, y (ii) administrar a dicho paciente un primer agente terapéutico que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-VIH descrito anteriormente o una porción de unión a antígeno del mismo. Esta descripción proporciona además un kit que comprende una unidad de dosis farmacéuticamente

aceptable de una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-VIH aislado descrito anteriormente o una porción de unión a antígeno del mismo.

5 Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen en la descripción más abajo. Otras características, objetivos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

10 Las Figuras 1a, 1b y 1c son diagramas que muestran la caracterización del inmunógeno RC1. La Figura 1a muestra las posiciones de N-glicanos (esferas coloreadas) y el motivo GDIR (SEQ ID NO: 15) (superficies rojas) en parches de glicano V3 de los trímeros de Env wtBG505, _11MUTB y RC1. Las coordenadas de los glicanos se asignan a una representación de superficie de la estructura del trímero de Env wtBG505 (PDB 5T3Z) (glicano N137 de PDB 5FYL) vista en la orientación de arriba hacia abajo. La Figura 1b muestra una comparación de las estructuras de wtBG505 (PDB 5T3Z) (izquierda) y RC1 (derecha) (estructura de crio-ME 4.0 Å) en complejo con 10-1074 Fab. Los complejos trímero de Env-Fab se muestran desde un lado como representaciones de superficie con átomos de glicano como esferas coloreadas. El panel central muestra una superposición en primer plano de las regiones encuadradas de los complejos 10-1074 con wtBG505 y RC1. Las regiones proteicas se muestran en representaciones de dibujos (V_H y V_L de 10-1074 en violeta oscuro y claro, regiones GDIR de Env en rojo (SEQ ID NO: 15), otras porciones de RC1 en trigo, wtBG505 en gris y las coordenadas de glicano en N156 de la estructura de wtBG505 se muestran como esferas naranjas. Las ubicaciones de las regiones de V1 que muestran el mayor desplazamiento entre las estructuras (residuos 139-140 de gp120) se indican mediante puntos con una flecha que muestra el desplazamiento. Los residuos 149-151 de V1 están ordenados en la estructura de RC1, pero no en la estructura de wtBG505. La Figura 1c muestra datos de unión de SPR (R_{eq} , respuesta de unión en equilibrio, frente al logaritmo de la concentración de proteína inyectada) mostrados para experimentos en los que se inyectó el Fab para el iGL común de PGT121 y 10-1074 sobre los trímeros de Env inmovilizados indicados. N.B. = sin unión por encima del fondo.

15 Las Figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 2j, 2k y 2l son diagramas que muestran la inmunización de ratones de tipo salvaje con RC1 que provoca anticuerpos contra el parche de glicano. La Figura 2a son resultados de ELISA representativos que muestran la unión del suero de ratones con inserción génica que portan el anticuerpo iGL de PGT121/10-1074 contra _11MUTB después de la inmunización con _11MUTB (izquierda) y contra RC1 después de la inmunización con RC1 (derecha). Los controles incluyen suero no expuesto, PGT121 purificado e iGL-PGT121. La Figura 2b muestra el área bajo la curva (AUC) para ELISA como en la Figura 2a, pero que combinan los resultados de 2 experimentos independientes que usan 3 ratones cada uno. Cada punto representa el suero de un ratón. La Figura 2d muestra resultados de ELISA representativos para la unión del suero de ratones de tipo salvaje inmunizados con _11MUTB (izquierda) y RC1 (derecha) a _11MUTB y RC1 respectivamente. La Figura 2d muestra el AUC para ELISA como en c, pero que combinan los resultados de 2 experimentos que usan 3 ratones cada uno. Cada punto representa el suero de un ratón. La Figura 2e muestra la unión del suero de un ratón de tipo salvaje representativo inmunizado con RC1 a RC1 y RC1-glicanoKO en ELISA. La Figura 2f muestra la relación del AUC para RC1 frente a RC1-glicano KO en ELISA como en la Figura 2e. El gráfico muestra los resultados combinados de 7 experimentos con 2-3 ratones inmunizados con RC1. Cada punto representa un ratón. La Figura 2g muestra resultados de ELISA representativos que muestran la unión del suero de ratones de tipo salvaje inmunizados con _11MUTBΔ301 a _11MUTBΔ301. La Figura 2h muestra la relación del AUC para RC1 frente a RC1-glicano KO en ELISA para ratones de tipo salvaje inmunizados con RC1 o RC1-4fill. La Figura 2i son gráficos de pastel que muestran la expansión clonal de células B del centro germinal de unión a RC1 según lo determinado por secuenciación del gen de IgV_H. Las porciones del pastel coloreadas son proporcionales al número de parientes clonales. El blanco indica secuencias únicas de IgV_H. El número en el centro indica el número de cadenas pesadas analizadas. La Figura 2j muestra mutaciones de nucleótidos de IgH de ratones no expuestos e inmunizados con RC1 en la Figura 2i. La Figura 2k muestra la unión de anticuerpos monoclonales obtenidos de ratones inmunizados con RC1 a RC1 y RC1-glicanoKO en ELISA. La Figura 2l muestra la caracterización del patrón de unión de Ab275_{MUR} y Ab276_{MUR} aislados de ratones de tipo salvaje inmunizados con RC1 y RC1-4fill mediante ELISA en las proteínas Env indicadas. La Figura 2l divulga "GAIA" como la SEQ ID NO: 16.

20 Las Figuras 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i y 3j son un conjunto de diagramas que muestran que la inmunización de macacos con VLP de RC1-4fill provoca anticuerpos anti-parche de glicano V3 que se asemejan a los iGL de bNAb. La Figura 3a muestra una representación de VLP de RC1-4fill que muestra RC1, spytag, spycatcher y VLP. La Figura 3b muestra micrografías electrónicas de VLP (parte superior) y RC1-4fill-VLP (parte inferior). La Figura 3c muestra la unión del suero de 4 conejos inmunizados con VLP de RC1-4fill, un control no expuesto y los anticuerpos monoclonales PGT121 y 3BNC117 a RC1 (negro) y RC1-glicanoKO (gris) que se muestra como área bajo la curva de ELISA (AUC). La Figura 3d muestra la unión del suero de 8 macacos Rhesus inmunizados con VLP de RC1-4fill, un control no expuesto y los anticuerpos monoclonales PGT121 y 3BNC117 a RC1 (negro) y RC1-glicanoKO (gris) que se muestra como área bajo la curva de ELISA (AUC). La Figura 3e son diagramas de puntos de citometría de flujo representativos que muestran la unión de células B del centro germinal de macaco a RC1-PE (eje Y) y RC1-AF647 o RC1-glicano KO (eje X) para macacos no expuestos (izquierda) e inmunizados (derecha). La Figura 3f muestra el por ciento de todas las células B en los centros germinales de muestras de ganglios linfáticos de 4 macacos no expuestos o 4 inmunizados que se unen a RC1 pero no a RC1-glicanoKO por citometría de flujo. La Figura 3g son gráficos de pastel que muestran la expansión clonal de células B del centro germinal que se unen a RC1 según lo determinado por secuenciación del

gen de IgH. El número en el centro indica el número de secuencias de IgV_H analizadas. La Figura 3h muestra mutaciones de IgV_H para todas las secuencias de la Figura 3g; cada punto representa una IgV_H. La Figura 3i muestra la secuencia de iGL de CDRL3 (SEQ ID NO: 446) para PGT121/10-1074 y diagramas de logo para todas las cadenas IgL clonadas a partir de células B del GC que se unen a RC1 de macacos inmunizados. La Figura 3j muestra una fracción de secuencias de CDR3 de IgL clonadas a partir de células B del GC de 4 macacos no expuestos y 4 inmunizados con RC1 que muestran un motivo similar a DSS.

Las Figuras 4a, 4b, 4c, 4d y 4e muestran anticuerpos monoclonales de macacos inmunizados con VLP de RC1-4fill que se unen al parche de glicano V3. La Figura 4a muestra los resultados de ELISA para la unión de anticuerpos monoclonales de macaco a RC1 y RC1-glicanoKO-GAIA ("GAIA" descrita como SEQ ID NO: 16). Los controles son 10-1074 y 3BNC117. La Figura 4b muestra la longitud de CDR3 de IgH de anticuerpos de macaco específicos contra el parche de glicano V3. La Figura 4c muestra una serie de mutaciones de nucleótidos en las regiones IgV_H e IgV_L de anticuerpos de macaco específicos contra el parche de glicano V3. La Figura 4d muestra el área bajo la curva (AUC) para ELISA en las proteínas indicadas para los anticuerpos Ab876_{NHP}, Ab897_{NHP}, Ab933_{NHP}, Ab936_{NHP}, Ab1170_{NHP}, 3BNC117 y 10-1074. La Figura 4e describe "GAIA" como SEQ ID NO: 16.

Las Figuras 5a, 5b y 5c muestran una comparación de las estructuras de 10-1074 y los anticuerpos provocados unidos al inmunógeno RC1. La Figura 5a muestra vistas de arriba hacia abajo de la orientación de unión de Fab de 10-1074 en comparación con otros Fab de bNAb contra parche de glicano V3 (PGT128 y PGT135; PDB 5ACO y 4JM2) (izquierda), Ab275_{MUR} (segundo desde la izquierda), Ab874_{NHP} (tercero desde la izquierda) y Ab897_{NHP} (derecha). Las estructuras de Env y Fab se muestran en representaciones de dibujos. La Figura 5b (panel superior) muestra los dominios V_H-V_L de 10-1074 (izquierda) y Fab de anticuerpos provocados (tres paneles de la derecha) unidos al parche de glicano V3 en un protómero del trímero RC1 (de estructuras de crio-ME de complejos de 10-1074 (izquierda), Ab275_{MUR} (segundo desde la izquierda), Ab874_{NHP} (tercero desde la izquierda) y Ab897_{NHP} (derecha) unidos al trímero de Env RC1). Los residuos de GDIR (SEQ ID NO: 15) en gp120 están resaltados en rojo y las coordenadas de glicano se muestran como esferas coloreadas. La Figura 5b (panel inferior) muestra una rotación de 90° de complejos en los paneles superiores para mostrar vistas de arriba hacia abajo de los sitios de combinación de anticuerpos con CDR resaltadas como lazos y glicanos de gp120 (esferas coloreadas) y regiones GDIR (SEQ ID NO: 15) (rojas) de RC1 asignados en sitios de combinación de anticuerpos. La Figura 5c muestra comparaciones de interacciones del motivo GDIR (SEQ ID NO: 15) con 10-1074 y con anticuerpos provocados.

Las Figuras 6a y 6b muestran la caracterización de RC1 mediante la evaluación de sus interacciones con bNAb mediante ELISA. La Figura 6a muestra que un bNAb específico para V1-V2 que interactúa con el glicano32 en N156 mostró una unión reducida a RC1 en comparación con BG505, y la ausencia del PNGS N156 mejora la neutralización por PGT121 y 10-1074. La Figura 6b muestra que los bNAb que se dirigen al epítipo de glicano V3, el sitio de unión de CD4 o la interfaz gp120-gp41 se unen de manera similar a RC1 y BG505.

Las Figuras 7a, 7b, 7c y 7d muestran el estudio crio-ME de una sola partícula de RC1, respectivamente, en complejo con el fragmento de unión a antígeno (Fab) de 10-1074 (Figura 7a), Ab874_{NHP} (Figura 7b), Ab275_{MUR} (Figura 7c) y Ab897_{NHP} (Figura 7d).

La Figura 8 muestra que el suero de los ratones inmunizados con RC1 tuvo una reacción cruzada con₁₁MUTB pero no con la Env 10MUT más nativo o con BG505.

Las Figuras 9a, 9b, 9c y 9d muestran la caracterización de RC1 y RC1-4fill y su respuesta a los sitios inespecíficos.

La Figura 10 muestra la caracterización de las respuestas humorales provocadas por RC1 y RC1-4fill en ratones de tipo salvaje. Se secuenciaron los genes de anticuerpos de células B del GC individuales que se unían a RC1 pero no a RC1-glicanoKO.

Las Figuras_{11a, 11b, 11c y 11d} muestran que RC1 y RC1-4fill expandieron células B específicas contra el parche de glicano V3 en ratones de tipo salvaje. Ambos anticuerpos aislados de ratones inmunizados con RC1 (Ab275_{MUR}) o RC1-4fill (Ab276_{MUR}) se unieron a₁₁MUTB, pero no a BG505 ni a un péptido que cubre la corona del lazo V3 (Figura_{11a}). Ab275_{MUR} se unió a RC1 con una K_D~30 nM (Figura_{11b}). Es importante destacar que Ab275_{MUR} retuvo la unión a₁₁MUTB (K_D~230 nM), lo que demuestra que podría alojar el glicano en N156 (Figura_{11c}). Las mutaciones adquiridas fueron esenciales para la unión porque la reversión a la secuencia de iGL condujo a la pérdida de unión a RC1 (Figura_{11d}).

La Figura 12 muestra que VLP-RC1-4fill provoca anticuerpos contra el parche de glicano V3 en conejos y macacos Rhesus. El suero de los macacos sensibilizados con VLP de RC1-4fill mostró una unión secuencialmente reducida a los inmunógenos más similares a los nativos₁₁MUTB y 10MUT.

Las Figuras 13a, 13b, 13c, 13d, 13e, 13f, 13g, 13h, 13i y 13j (colectivamente "Figura 13") son un conjunto de diagramas que muestran la caracterización de los inmunógenos, incluido RC1-3fill. La Figura 13a es un diagrama que muestra cromatogramas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para los inmunógenos RC1, RC1-3fill y RC1-4fill. La Figura 13b proporciona los rendimientos representativos de una expresión de 1L en células HEK 293T 6E para cada

inmunógeno. Las Figuras 13c, 13d, 13e y 13f son un conjunto de diagramas que muestran cromatogramas de SEC y micrografías electrónicas para los inmunógenos RC1 y RC 1-3fill. La Figura 13g muestra cromatogramas de SEC representativas de la purificación de las AP205-RC1-VLP y AP205-RC1-3fill-VLP. La Figura 13d muestra micrografías electrónicas de las AP205-RC1-VLP (izquierda) y AP205-RC1-3fill-VLP (derecha). La Figura 13e muestra cromatogramas de SEC representativas de la purificación de mi3-RC1-NP y mi3-RC1-3fill-NP. La Figura 13f muestra micrografías electrónicas de mi3-RC1-NP (izquierda) y mi3-RC1-3fill-NP (derecha). Las Figuras 13f y 13h muestran los perfiles de SEC tanto de la purificación inicial de AP205-RC1-VLP (Figura 13f) como de mi3-RC1-NP (Figura 13h), y la reinyección de la muestra a los 28 días (AP205) y 11 días (mi3). Las Figuras 13i y 13j muestran la unión del suero de 6 ratones WT inmunizados con mi3-RC1-NP (Figura 13i) o mi3-RC1-3fill-NP (Figura 13j), un control no expuesto y los anticuerpos monoclonales 10-1074 y 3BNC117 a RC1 y RC1-glicanoKO se muestran como área bajo la curva de ELISA (AUC).

Descripción detallada de la invención

Los inmunógenos descritos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto se basan en un descubrimiento inesperado de que un nuevo inmunógeno, RC1, y sus variantes, activa las células B que expresan precursores de bNAb dentro de repertorios policlonales.

Los anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAb) protegen contra la infección por VIH-1, lo que sugiere que una vacuna que los provoque sería eficaz. Sin embargo, uno de los principales obstáculos es que la vacunación no provoca bNAb, en parte porque las células B que expresan precursores de bNAb de la línea germinal no responden a los antígenos de la envoltura (Env) del VIH-1 similares a los nativos. En consecuencia, esta descripción proporciona inmunógenos que facilitan el reconocimiento del parche de glicano V3 en Env de VIH-1 mientras ocultan regiones inmunodominantes no conservadas, por ejemplo, mediante la adición de glicanos y/o la multimerización en partículas similares a virus. Esta descripción demuestra que las inmunizaciones de ratón, conejo y macaco Rhesus con los inmunógenos descritos (*por ejemplo*, RC1, RC1-4fill, RC1-3fill) provocaron respuestas serológicas dirigidas al parche de glicano V3. Además, la clonación de anticuerpos y las estructuras de crio-ME de complejos anticuerpo-Env confirmaron que la inmunización con RC1 expande clones de células B que portan anticuerpos anti-parche de glicano V3 que se asemejan a los precursores predichos de bNAb humanos. Por lo tanto, los inmunógenos descritos, tales como RC1, son un inmunógeno sensibilizante adecuado para estrategias de vacunación secuencial para estimular una respuesta inmunitaria (*por ejemplo*, respuesta inmunitaria contra el VIH) en un sujeto.

I. Inmunógenos y composiciones inmunogénicas

A. Polipéptido

Esta descripción proporciona un inmunógeno y sus variantes para estimular una respuesta inmunitaria (*por ejemplo*, respuesta inmunitaria contra el VIH) de un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el inmunógeno incluye una porción de la proteína de la envoltura del VIH, es decir, gp120, que se ubica en la superficie del VIH. Gp120 es el segmento N-terminal de la proteína de la envoltura del VIH gp160, anclado en la bicapa de la membrana en su región carboxilo terminal. Gp120 sobresale en el ambiente acuoso que rodea al virión, mientras que su contraparte C-terminal, gp41, atraviesa la membrana. La molécula gp120 consiste en un núcleo polipeptídico de 60 000 daltons, que se modifica ampliamente mediante glicosilación por enlace a N para aumentar el peso molecular aparente de la molécula a 120 000 daltons. La secuencia de aminoácidos de gp120 contiene cinco dominios relativamente conservados intercalados con cinco dominios hipervariables. Las posiciones de los 18 residuos de cisteína en la secuencia primaria de gp120 y las posiciones de 13 de los aproximadamente 24 sitios de glicosilación por enlace a N en la secuencia de gp120 son comunes a todas las secuencias de gp120.

En algunas modalidades, el inmunógeno puede incluir la región Env V3 de gp120. La región Env V3 de gp120 abarca el epítipo del parche de glicano V3, que incluye un grupo de N-glicanos de tipo complejo y con alto contenido de manosa que rodean la región Env V3. En el epítipo del parche de glicano V3, la glicosilación generalmente ocurre en los residuos de gp120 N133, N137, N156, N295, N301, N332, N339, N385 y N392. Los bNAb, tales como PGT121, 10-1074 y BG18, se dirigen al epítipo del parche de glicano V3. Llegan a través de los glicanos mediante el uso de lazos de CDRH3 alargados y porciones de CDRL1 y CDRL3 para contactar con el motivo GDIR altamente conservado (G324-D325-I326-R327) (SEQ ID NO: 15) en la base del lazo de V3.

En algunas modalidades, el inmunógeno puede incluir una o más modificaciones en la región Env V3 de gp120. El inmunógeno comprende un polipéptido que tiene una secuencia que es al menos 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 11 y 13 enumeradas en la Tabla 1. El polipéptido puede incluir sustituciones en uno o más sitios de glicosilación (*por ejemplo*, N133, N137, N156, N295, N301, N332, N339, N385 y N392) en la región Env. *Por ejemplo*, el polipéptido puede incluir una sustitución en las posiciones correspondientes a N133, N137 y N156 de la SEQ ID NO: 1. En un ejemplo, el polipéptido incluye una sustitución N156Q o una sustitución conservativa de N156. En otro ejemplo, el polipéptido, tal como RC1 (SEQ ID NO: 2; Tabla 1), incluye eliminaciones en N133, N137 y N156 y sustituciones adicionales que incluyen V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M y T415V. Como se ilustrará en los ejemplos, los inmunógenos descritos, tales como RC1, activan y expanden un grupo diverso de células B que expresan anticuerpos que se asemejan a los precursores

ES 2 993 834 T3

de bNAbs contra glicano V3 humanos en ratones, conejos y macacos Rhesus.

Tabla 1. Secuencias de inmunógenos del VIH.

SEQ ID NO.	Secuencia	Otra información
5 10 15	<p>SEQ ID NO: 1</p> <p>MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPSQEIHARFRRGARAENLWVTV YYGVPVWVKDAETTLFCASDAKAYETEKHNWVATHACVPTDPNPQE IHLENVTEEFNMWKNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTL QCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTTELRLDKKQKVYSLFYRLDVV QINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGF AILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIKPWSTQLLLNGSLAEVEVM IRSENIITNAKNILVQFNTPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD IIGDIRQAHCNVSKATWNETLGKWKQLRKHFNNNTIIRFANSSGGDL EVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPC RIKQIINMWQRIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTET FRPGGGDMRDNRSELYKYKWKIEPLGVAPTRCKRRRVVGRRRRR RAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLL RAPEAQQHLLKLTWVGIKQLQARVLAVERYLRDQQLLGIWGCSSGK LICTNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIYGLLEE SQNQKEKNEQDLLALD</p>	<p>11MUTB (SOSIP.664) derivado de wtBG505 (los cambios realizados en wtBG505 están subrayados y en negrita)</p>
20 25 30	<p>SEQ ID NO: 2</p> <p>MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVVYGVPVWVKDAE TTLFCASDAKAYETEKHNWVATHACVPTDPNPQEIHLENVTEEFNM WKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTELRLDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNS NKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGT GPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEVEVIIRSENIITNAKNIL VQLNTPVQINCTRPNNNTVKSIRIGPGQAFYFVDIIGDIRMAHCNVS KATWNETLGKVVVKQLRKHFNNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGG EFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRI GQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRD NWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRRVVGRRRRRRAVGIGAVSLG FLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQHLLK DTHWVGIKQLQARVLAVERYLRDQQLLGIWGCSSGKLICTNVPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIYGLLEESQNQKEKNEQD LLALD</p>	<p>RC1</p>
35 40 45 50 55 60 65	<p>SEQ ID NO: 3</p> <p>ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCACCTGTGATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACCTTTTGGCCCTCCGACGCTAAAGCATACGAAACGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCTACAGACCCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAAACATG TGGAAAAACAACATGGTGGAACAGATGCACGAGGATATCATTTT CCTGTGGGACCAAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAAACTACGCACCCAACCTTTTGTAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGCAGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCGGCGAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG GATAAGAAGTTTAAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAGCGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAG CGAGAACATAACTAACAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA TACACCTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGT GAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCGG AGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAAACGTGAGCA AGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAAGGTGGTCAAACAGTTG CGCAAGCACTTTGGGAACAACACCAATTATTCGGTTTGCCAGTCT TCCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGGA GGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTACAT GGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCACCGGTAGCA ACGACAGCATCGTCTTGCCCTGTGAATCAAGCAGATCATTAAATA TGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGG GAGTCATTCCGGTGCCTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCA GAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAAACTTTCCGCCCA GGAGGAGGCGACATGCGGGA TAATTGGAGATCAGAGCTGTATAA GTATAAGGTGGTGA AAAATGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAATA GATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGCGGAGAGCA GTGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCTGGGTGCTGCCGGC AGTACAAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCCCG GAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAAGCAATCTGTTGAG AGCCCCGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTGGG GCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACC</p>	<p>RC1</p>

ES 2 993 834 T3

5	<p>TGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAA CTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAAC AGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAGTG GGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTCCT GGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCTG CTTGCCCTTGACTGA</p>	
10 15 20	<p>SEQ ID NO: 4</p> <p>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYGVVWVWDAE TTLFCASDAKAYETEKHNWVWATHACVPTDNPQEIHLNVTEEFNM WKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTELDRDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNS NKEYRLINCNTSAITQACPVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNFT GPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEEVIIRSENITNNAKNIL VQLNTPVQINCRPNNTVKSIRIGPGQAFYFQDIIGDIRMAHCNVS KATWNETLGVVVKQLRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGG EFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRI GQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRD NWRSELYKYVVKIEPLGVAPTRCKRRVVGRRRRRRAVGIGAVSLG FLGAAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQHLLK DTHWGIKQLQARVLAVEHYLRDQQLGIWGCSSGKLICCTNVPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIYGLLEESQNNQEKNEQD LLALDGGGGSGGGSGGGSGGAHIVMVDAYKPTK</p>	RC1 spytag
25 30 35 40 45 50 55	<p>SEQ ID NO: 5</p> <p>TGAAAAACAACATGGTGGAAACAGATGCACGAGGATATCATTTT CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAAACTACGCACCCAACCTTTTGGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG GATAAGAAAGTTTAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAGCGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCAATAATGAGGAG CGAGAACATAACTAACACGCTAAAAACATTTCTCGTCCAGCTCAA TACACCTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGT GAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCGG AGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAAACGTGAGCA AGGCCACCTGGAACGAGACCCCTGGGCAAGGTGGTCAAACAGTTG CGAAGCACTTTGGGAACAACACCAATTATTCCGTTTGCAGTCT TCCGGCGGCGACCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGGA GGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTACAT GGATCTCAAATACCAAGTGTCCAGGGGTCAAATTCACCGGTAGCA ACGACAGCATCGTCTTGCCCTTGTGCAATCAAGCAGATCATAATA TGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGG GAGTCATTCCGGTGCCTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCA GAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAACTTTCCGCCCA GGAGGAGGCGACATGCCGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTATAA GTATAAGGTGGTGAATAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCAACTA GATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGCGGAGAGCA GTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCTGGGTGCTGCCGGC AGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCCCG GAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAGCAATCTGTTGAG AGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTGGG GCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACC TGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAA CTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAAC AGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAGTG GGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTCCT GGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCTG CTTGCCCTTGACGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGCGGATCTGGCGGT GGGAGCGGTTCCGGAGCCCATATAGTGATGGTTGATGCCTATAAA CCGACCAAGTGA</p>	RC1 spytag
60 65	<p>SEQ ID NO: 6</p> <p>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYGVVWVWDAE TTLFCASDAKAYETEKHNWVWATHACVPTDNPQEIHLNVTEEFNM WKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTELDRDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNS NKEYRLINCNTSAITQACPVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKNKTFTNGT GPCPNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEEVIIRSENITNNAKNIL VQLNTPVQINCRPNNTVKSIRIGPGQAFYFQDIIGDIRMAHCNVS KATWNETLGNVSKQLRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGGE FFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRIG QAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDN WRSELYKYVVKIEPLGVAPTRCKRRVVGRRRRRRAVGIGAVSLGF LGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQHLLKD</p>	RC1-4fill

ES 2 993 834 T3

	THWGIKQLQARVLA VEHYLRDQQLGIWGC SGK LICCTNVPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQD LLALD	
5	SEQ ID NO: 7	RC1-4fill
10	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCACTGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACTCTTTTGC GCCTCCGACGCTAAAGCATACGAAACGGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAAACATG TGGAAAAACAACATGGTGGAAACAGATGCACGAGGATATCATTTT CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAAACTACGCACCCAACCTTTTGGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG AATAAGACGTTTAAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAACGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTATAATTAGGAG CGAGAACATAACTAACACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA TACAAGTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACCCG TGAAGTCCATTAGAAATGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCG GAGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACGTGAGC AAGGCCACCTGGAACGAGACCCCTGGGCAATGTGAGCAAACAGTT GCGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTGGGTTTGGCCAGTC TTCCGGCGGGCAGCCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGG AGGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCCTGTTCAACTCTAC ATGGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCACCCGGTAG CAACGACAGCATCGTCTTGCCCTTGTGCAATCAAGCAGATCATTAA TATGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACA GGGAGTCATTCGGTGCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCAC CAGAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAACTTTCCGCC CAGGAGGAGGCACATGCGGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTAT AAGTATAAGGTGGTGA AAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAAC TAGATGTA AACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGGCGGAGAG CAGTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCTGGGTGCTGCCG GCAGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCC CGGAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAGCAATCTGTTG AGAGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTG GGGCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATT CCTGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAA AACTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAA ACAGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAG TGGGACAAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTC CTGGAGGAAAGCCAGAAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCT GCTTGCCCTTGACTGA	
45	SEQ ID NO: 8	RC1-4fill spytag
50	MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYVYVVPVWKDAE TTLFCASDAKAYETEKHNWVATHACVPTDPNPQEIHLNVTEEFNM WKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNYAPNLLSN MRGELKQCSFNMTTELDRDKKQKVYSLFYRLDQVQINENQGNRNSNS NKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKNKTFNGT GPCPNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAE EEEVIIRSENITNNAKNIL VQLNTSVQINCTRPNNNTVKSIRIGPGQAFYFVGDIIIGDIRMAHCNVS KATWNETLGNVSKQLRKHFNNIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGGE FFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRIG QAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDN WRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRVVGRRRRRRRAVGIGAVSLGF LGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQHLLKD THWGIKQLQARVLA VEHYLRDQQLGIWGC SGK LICCTNVPWNSS WSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQD LLALDGGGGSGGGSGGGSGGSAHIVMVDAYKPTK	
60	SEQ ID NO: 9	RC1-4fill spytag
65	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCACTGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAGAGACA ACACTCTTTTGC GCCTCCGACGCTAAAGCATACGAAACGGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCCTAAC CCTCAGGAAATTCATCTTGAAAATGTCACAGAAGAGTTTAAACATG TGGAAAAACAACATGGTGGAAACAGATGCACGAGGATATCATTTT CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAAACTACGCACCCAACCTTTTGGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG	

ES 2 993 834 T3

5	GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG AATAAGACGTTTAATGGGACAGGCCCTTGCCCTAACGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCATAATTAGGAG CGAGAACATAACTAACACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAA TACAAGTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCG TGAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCG GAGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACTGAGC AAGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAATGTGAGCAAAACAGTT GCGAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTCCGGTTTGCCGACTC TTCCGGCGGGCAGCCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGG AGGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTAC ATGGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCACCCGGTAG CAACGACAGCATCGTCTTGCCTTGTGGAATCAAGCAGATCATTAA TATGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACA GGGAGTCAATCGGTGCGTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCAC CAGAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAAAACCTTCCGCC CAGGAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTAT AAGTATAAGGTGGTGAATAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAAC TAGATGTAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGGCGGAGAG CAGTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCTGGGTGCTGCCG GCAGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCC CGGAATCTTCTAGCGGAATTGTGCAACAACAAGCAATCTGTTG AGAGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTG GGGCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATT CCTGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCAATGGGGATGCTCAGGAA AACTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAA ACAGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGGTTGCAG TGGGACAAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTC CTGGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCT GCTTGCCCTTGACGCTGGAGGCGGTTTCAAGCGGGGATCTGGCGG TGGGAGCGGTTTCCGGAGCCCATATAGTGATGGTTGATGCCTATA ACCGACCAAGTGA		
35	SEQ ID NO: 10	KGKGGKGGKGGCTRPNNNTRKSIRIGPQQTFYATGDIIIGDIRQAHC	Lazo V3-peptido C consenso
40	SEQ ID NO: 11	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTVYGVVPVW KDAETTLFCASDAKAYETEKHNWVWATHACVPTDNPQEIHLE NVTEEFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTL QCTNYAPNLLSNMRGELKQCSFNMTTELDRKQKQVYSLFYRL DVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIH YCAPAGFAILKCKNKTFNGTGPCPNVSTVQCTHGKIPVSTQL LLNGSLAEVEEVIIRSENITNNAKNILVQLNTPVQINCTRPNNNTV KSIIRIGPQAFYFQDIIIGDIRMAHCNVSKATWNETLGNVSKQ LRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGGEFFYCNSTGLFN STWISNTSVQGSNSTGSNDSIVLPCRIKQIINMWQRIGQAMYAP PIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDNWRS ELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRRVVGRRRRRRAVIGAVSLG FLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQ HLLKDTHWGIKQLQARVLAVEHYLRDQQLLGIWGCSSGKLIIC TNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIYGLLE ESQNNQEKNEQDLLALD	RC1-3fill
50	SEQ ID NO: 12	ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCT GTGTGGCGCCGTGTTTGTAGCCCGCTGGGGCCGGATCCA ACCTGTGGGTCAGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAG GATGCAGAGACAACACTCTTTTGCCTCCGACGCTAAAGC ATACGAAACGGAGAAGCACAACGTGTGGGCGACCCATGCC TGTGTCCCTACAGACCCTAACCTCAGGAAATTCATCTTGA AAATGTCAACAGAAGAGTTTAACATGTGGAAAAACAACATG GTGGAACAGATGCACGAGGATATCATTTCCCTGTGGGACCA GAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCTGTGCGTGA CTCTCCAGTGTACAACTACGCACCCAACCTTTTGGAGTAAT ATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCT ACCGGCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAA TAGAAGCAACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAAT TGCAATTACCAGCGCTATTACGCAGGCTTGCCCTAAGGTGAG CTTTGAGCCAATCCCGATACATTATTGTGCCCGGCAGGCTT CGCTATACTGAAATGCAAGAATAAGACGTTTAAATGGGACAG GCCCTTGCCCTAACGTTTCAACGGTCCAATGTACCCACGGG ATCAAGCCGTAGTGTCTACACAGCTCCTGCTGAACGGCAG CCTGGCCGAAGAGGAGTGCATAATTAGGAGCGAGAACATA	RC1-3fill

ES 2 993 834 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

	<p>ACTAACAAACGCTAAAAACATTCTCGTCCAGCTCAATACACC TGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGTGA AGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTC GGAGATAAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACTG GAGCAAGGCCACCTGGAACGAGACCCCTGGGCAATGTGAGC AAACAGTTGCGCAAGCACTTTGGGAACAACACCATTATTTCG GTTTGCCAGTCTTCCGGCGGGCAGCCTTGAAGTGACCACCT ATAGCTTCAACTGTGGAGGGGAGTTTTTCTATTGCAATACAT CAGGCCGTTCAACTCTACATGGATCTCAAATACCAGTGTC CAGGGGTCAAATTCACCGGTAGCAACGACAGCATCGTCTT GCCTTGTGCAATCAAGCAGATCATTAATATGTGGCAGAGGA TTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGGGAGTCATT CGGTGCGTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCAGAGA TGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAACTTTCCGCCAG GAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTA TAAGTATAAGGTGGTGAATAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGC CAACTAGATGTAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCG GCGGAGAGCAGTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTTCC TGGGTGCTGCCGGCAGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACG CTCACAGTGCAGGCCCGGAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCA ACAACAAAGCAATCTGTTGAGAGCCCCGGAACCGCAGCAA CATCTGTTGAAGGACACACATTGGGGCATCAAGCAGCTGCA AGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACCTGAGAGACCAAC AGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAACCTGATCTGC TGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAACAGGAA CCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGTTGCAAGTGGG ACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTC CTGGAGGAAAGCCAGAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGG ATCTGCTTGCCTTGACTGA</p>	
<p>SEQ ID NO: 13</p>	<p>MDAMKRGRLCCVLLCGAVFVSPAGAGSNLWVTYYYGVPVW KDAETTLFCASDAKAYETEKHNWVATHACVPTDPNPQEIHLE NVTEEFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTL QCTNYAPNLLSNMRGELKQCSFNMTTELDRDKKQKVYSLFYRL DVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKVSFEPIPIH YCAPAGFAILKCKNKTFNGTGPCPNVSTVQCTHGKIPVYSTQL LLNGSLAEEVVIIRSENITNNAKNILVQLNTPVQINCTRPNNNTV KSRIRPGQAFYFYGDIIGDIRMAHCNVSKATWNETLGNVSKQ LRKHFGNNTIIRFAQSSGGDLEVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFN STWISNTSVQGSNSTGNSDIVLPCRIKQIINMWQRIGQAMYAP PIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDNWRS ELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKRRRVVGRRRRRRAVGIGAVSLG FLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQSNLLRAPEPQQ HLLKDTHWGIKQLQARVLAVEHYLRDQQLLGIWGC SGKLICC TNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIYGLLE ESQNQKEKNEQDLLALDGGGGSGGGSGGGSGSGAHIVMVDA YKPTK</p>	<p>RC1-3fill-Spytag</p>
<p>SEQ ID NO: 14</p>	<p>ATGGACGCCATGAAGAGGGGACTTTGCTGTGTTCTTCTGCTGTGT GGCGCCGTGTTTGTAGCCCCGCTGGGGCCGGATCCAACCTGTGG GTCACGTGTATTATGGTGTGCCAGTGTGGAAGGATGCAAGACA ACACTCTTTTGGCCTCCGACGCTAAAGCATAACGAAACGGAGAAG CACAACGTGTGGGCGACCCATGCCTGTGTCCCTACAGACCCTAAC CCTCAGGAAATTATCTTGAATAATGTCACAGAAGAGTTTAAACATG TGGAAAAACAACATGGTGGAAACAGATGCACGAGGATATCAATTC CCTGTGGGACCAGAGTCTGAAACCATGTGTCAAACCTTACTCCTCT GTGCGTGACTCTCCAGTGTACAACTACGCACCCCAACCTTTTGGAG TAATATGCGGGGCGAGCTCAAGCAGTGCAGTTTCAATATGACAAC CGAATTGAGAGACAAAAAACAGAAAGTATACTCCCTCTTCTACCG GCTGGACGTGGTGCAGATCAATGAGAACCAAGGAAATAGAAGCA ACAACAGTAACAAGGAATACCGGCTCATAAATTGCAATACCAGC GTATTACGCAGGCTTGCCTAAGGTGAGCTTTGAGCCAATCCCG ATACATTATTGTGCCCGGCAGGCTTCGCTATACTGAAATGCAAG AATAAGACGTTTAAATGGGACAGGCCCTTGCCTAACGTTTCAACG GTCCAATGTACCCACGGGATCAAGCCCGTAGTGTCTACACAGCTC CTGCTGAACGGCAGCCTGGCCGAAGAGGAGGTCAATTAAGGAG CGAGAACATAACTAACACGCTAAAAACATCTCGTCCAGCTCAA TACACCTGTGCAGATCAACTGCACCCGGCCCAACAACAACACCGT GAAGTCCATTAGAATTGGTCCGGGACAGGCATTTTACTACTTCGG AGATATAATAGGCGATATCAGAATGGCGCACTGTAACTGAGCA AGGCCACCTGGAACGAGACCCTGGGCAATGTGAGCAAACAGTTG CGCAAGCACTTTGGGAACAACACCAATTATTCCGTTTGGCCAGTCT TCCGGCGGGCAGCCTTGAAGTGACCACTCATAGCTTCAACTGTGGA GGGGAGTTTTTCTATTGCAATACATCAGGCCTGTTCAACTCTACAT GGATCTCAAATACCAGTGTCCAGGGGTCAAATTCACCGGTAGCA ACGACAGCATCGTCTTGCCTTGTGCAATCAAGCAGATCATTAATA TGTGGCAGAGGATTGGTCAGGCCATGTACGCACCTCCAATACAGG</p>	<p>RC1-3fill-Spytag</p>

ES 2 993 834 T3

5

10

15

GAGTCATTCGGTGCCTCAGCAATATTACTGGATTGATCCTCACCA GAGATGGCGGGAGTACCAATAGCACTACCGAACTTTCCGCCCA GGAGGAGGCGACATGCGGGATAATTGGAGATCAGAGCTGTATAA GTATAAGGTGGTAAAAATTGAACCCCTGGGAGTGGCGCCAACTA GATGTAAACGGCGAGTGGTTGGCCGGAGACGGCGGCGGAGAGCA GTGGGGATTGGCGCTGTCTCACTCGGTTTCCTGGGTGCTGCCGGC AGTACAATGGGCGCCGCCAGCATGACGCTCACAGTGCAGGCCCG GAATCTTCTTAGCGGAATTGTGCAACAACAAAGCAATCTGTTGAG AGCCCCGGAACCGCAGCAACATCTGTTGAAGGACACACATTGGG GCATCAAGCAGCTGCAAGCTCGGGTTCTGGCTGTTGAGCATTACC TGAGAGACCAACAGCTGCTGGGCATATGGGGATGCTCAGGAAAA CTGATCTGCTGCACCAATGTCCCATGGAACAGCTCATGGTCAAAC AGGAACCTGAGCGAGATCTGGGATAACATGACCTGTTGCAAGT GGACAAAGAAATTAGCAATTACACACAGATCATCTACGGCCTCCT GGAGGAAAGCCAGAAATCAGCAGGAGAAAAATGAGCAGGATCTG CTTGCCCTTGACGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGCGGATCTGGCGGT GGGAGCGGTTCCGGGAGCCCATATAGTGTATGGTTGATGCCTATAAA CCGACCAAGTGA

Las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos anteriores de inmunógenos del VIH incluyen la secuencia líder de secreción en el extremo N-terminal (para secuencias de aminoácidos) o en el extremo 5' (para secuencias de ácidos nucleicos). La secuencia líder de secreción es una señal de secreción general y no forma parte de la proteína expresada final/madura. Como entenderán los expertos en la técnica, también pueden usarse otras secuencias líderes de secreción para generar los mismos inmunógenos del VIH finales/maduros.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2. Variantes de inmunógeno y modificaciones específicas.

Proteína	PNGS		Otras modificaciones	Propósito
	Eliminado	Añadido		
RC1	133, 137, 156	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	Inmunización/ELISA
RC1-3fill	133, 137, 156	N230, N241, N344	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	Inmunización/ELISA
RC1-4611	133, 137, 156	N230, N241, N289, N344	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	Inmunización/ELISA
RC1-glicanoKO	133, 137, 156, 301, 332	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, H330A, MD39*	ELISA
RC1-glicanoKO-GAIA ("GAIA" descrita como SEQ ID NO: 16)	133, 137, 156, 301, 332	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, GDIR (SEQ ID NO: 15) /GAIA (SEQ ID NO: 16), H330A, MD39*	ELISA
RC1-GAIA ("GAIA" descrita como SEQ ID NO: 16)	133, 137, 156	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, GDIR (SEQ ID NO: 15) /GAIA (SEQ ID NO: 16), MD39*	ELISA

ES 2 993 834 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

11MUTBD301	133, 137, 301	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	Inmunización/ELISA
RC1D301	133, 137, 156, 301	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	ELISA
RC1D332	133, 137, 156,332	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	ELISA
11MUTB	133,137		V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, MD39*	Inmunización/ELISA
10MUT	133,137		V134Y, T135A, N136P, N137F, I138L, T139I, D140N, T320F, Q328M, MD39*	ELISA
7MUT	133,137		V134Y, T135A, N136P, N137F, I138L, T139I, D140N, MD39*	ELISA
5MUT	-	-	V134Y, N136P, I138L, D140N, MD39*	ELISA
BG505	-	-	MD39*	ELISA
VLP de RC1-4fill	133, 137, 156	N230, N241, N289, N344	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, Spytag, MD39*	Inmunización
RC1-Avitag	133, 137, 156	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, Avitag, MD39*	Clasificación
RC1-glicanoKO-Avitag	133, 137, 156,301, 332	-	V134Y, T135A, I138L, T139L, D140S, D141N, T320F, Q328M, T415V, H330A, Avitag, MD39*	Clasificación

"Polipéptido" se usa en su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica del producto. Los péptidos, polipéptidos y proteínas se incluyen dentro de la definición de polipéptido, y tales términos pueden usarse indistintamente en la presente descripción a menos que se indique específicamente de cualquier otra manera. Este término también incluye modificaciones después de la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como también otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto natural como de origen no natural. Un polipéptido puede ser una proteína completa o una subsecuencia de la misma. Una "variante" de polipéptido, como se usa el término en la presente descripción, es un polipéptido que típicamente difiere de un polipéptido descrito específicamente en la presente descripción en una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ser naturales o pueden generarse por síntesis, por ejemplo, mediante la modificación de una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores de la descripción y evaluación de una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en la presente descripción y/o mediante el uso de cualquiera de algunas técnicas bien conocidas en la

técnica.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin una pérdida apreciable de su capacidad para unirse a otros polipéptidos (por ejemplo, antígenos) o células. Dado que la capacidad de unión y la naturaleza de una proteína es lo que define la actividad biológica funcional de esa proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de la secuencia de aminoácidos en una secuencia proteica y, en consecuencia, en su secuencia codificante de ADN subyacente, de manera que se obtiene una proteína con propiedades similares. Por lo tanto se contempla que pueden hacerse varios cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones descritas, o en las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

Las secuencias de variantes incluyen aquellas en donde se han introducido sustituciones conservativas mediante modificación de polinucleótidos que codifican polipéptidos de esta descripción. Los aminoácidos se pueden clasificar de acuerdo con sus propiedades físicas y su contribución a la estructura proteica secundaria y terciaria. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de los aminoácidos son en las que el residuo de aminoácidos se sustituye con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

"Identidad de secuencia" u "homología" se refiere al porcentaje de residuos en la variante de secuencia polinucleotídica o polipeptídica que son idénticos a la secuencia no variante después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el por ciento máximo de homología. En modalidades particulares, las variantes de polinucleótidos y polipéptidos tienen al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % de homología de polinucleótido o polipéptido con un polinucleótido o polipéptido descrito en la presente descripción.

Las secuencias de variantes polipeptídicas pueden compartir 70 % o más (*es decir* 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) identidad de secuencia con las secuencias mencionadas en esta descripción. Las variantes polipeptídicas también pueden incluir fragmentos polipeptídicos que comprenden varias longitudes de tramos contiguos de secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción. Las secuencias de variantes polipeptídicas incluyen al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 o más péptidos contiguos de una o más de las secuencias descritas en la presente descripción, así como también todas las longitudes intermedias entre ellas.

Los inmunógenos descritos anteriormente pueden unirse específicamente a bNAb. Los bNAb son anticuerpos neutralizantes que neutralizan múltiples cepas virales del VIH-1. Los bNAb son únicos porque se dirigen a epítomos conservados del virus. Los ejemplos de anticuerpos ampliamente neutralizantes pueden incluir, sin limitación, VRC26.25, PCT64-24E, VRC38.01, PG9, PGDM1400, CHOI, BG18, DH270.1, DH270.6, PGDM12, VRC41.01, PGDM21, PCDN-33A, BF520.1, VRC29.03, PGT121, 10-1074, N49-P7, N6, NC-Cowl, IOMA, CH235, CH235.12, b12, VRC01, 3BNC117, CH103, VRC-PG05, VRC34.01, ACS202, PGT151, 35O22, 8ANC195, DH511.11P. Entre estos bNAb, los anticuerpos ampliamente neutralizantes BG18, DH270.1, DH270.6, PGDM12, VRC41.01, PGDM21, PCDN-33A, BF520.1, VRC29.03, PGT121, 10-1074 se unen específicamente a los glicanos V3. En algunas modalidades, los inmunógenos descritos se unen al anticuerpo ampliamente neutralizante PGT121 o 10-1074 con una afinidad que tiene una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 50 μM o menos.

Los términos "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente" y "se une específicamente" se refieren a la unión de un anticuerpo a un epítomo de un antígeno predeterminado pero no a otros antígenos. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente menos de 10⁻⁶ M, tal como aproximadamente menos de 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M o 10⁻¹⁰ M o incluso menos cuando se determina mediante, por ejemplo, ELISA, diálisis de equilibrio o tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento de resonancia de plasmón superficial BIACORE® 2000 mediante el uso del antígeno predeterminado, por ejemplo, un epítomo en la envoltura viral del VIH-1, por ejemplo, gp120, como el analito y el anticuerpo como el ligando, o análisis de Scatchard de la unión del anticuerpo a células positivas para el antígeno, y (ii) se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

En otro aspecto, esta descripción proporciona polipéptidos inmunógenos que están multimerizados en una partícula similar a virus (VLP) (por ejemplo, partícula similar a retrovirus, partícula similar a VIH). Las partículas similares a virus, o partículas similares a retrovirus, en el contexto de la presente descripción, son estructuras rodeadas de membrana que comprenden proteínas de la envoltura viral incrustadas dentro de la membrana de la célula huésped en la que se

5 producen, y preferentemente, proteínas del núcleo viral adicionales en las VLP. Estas VLP no contienen ácido nucleico viral intacto y no son infecciosas. Convenientemente, hay suficiente proteína de la envoltura en la superficie de la VLP de modo que cuando se formula una preparación de VLP en una composición inmunogénica y se administra a un animal o ser humano, se genera una respuesta inmunitaria (mediada por células o humoral). Convenientemente, la proteína Env está truncada desde el extremo carboxi terminal en comparación con la proteína de la envoltura viral natural. En el contexto de la presente invención, una proteína de la envoltura "truncada" es aquella que contiene menos de un dominio citoplasmático de longitud completa, pero retiene determinantes antigénicos de superficie contra los cuales se genera una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria protectora, y retiene secuencia de envoltura suficiente para el procesamiento adecuado del precursor y la inserción en la membrana. El experto puede producir proteínas de envoltura viral truncadas mediante el uso de tecnología de ADN recombinante y secuencias codificantes de virus, que están fácilmente disponibles para el público. Por ejemplo, la secuencia codificante de una proteína de la envoltura viral puede manipularse para su expresión en un vector de expresión de baculovirus, por ejemplo, mediante el uso de un vector de baculovirus disponible comercialmente, bajo el control regulador de un promotor viral, con modificaciones apropiadas de la secuencia para permitir la unión funcional de la secuencia codificante a la secuencia reguladora, y truncamiento (eliminación) de la porción de la secuencia codificante que codifica el dominio citoplasmático de la proteína de la envoltura, nuevamente con señales de parada de traducción apropiadas y secuencias que permiten el corte y empalme operable de la envoltura truncada y las secuencias asociadas en el vector. Una proteína de la envoltura del SIV truncada específicamente ejemplificada carece de 89 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la proteína de la envoltura del SIV natural.

20 En otro aspecto, esta descripción proporciona un complejo proteico que comprende al menos un polipéptido inmunógeno descrito anteriormente multimerizado por medio de enlace/interacción covalente o no covalente (por ejemplo, interacciones de van der Waals). Por ejemplo, dos o más polipéptidos inmunógenos pueden reticularse mediante uno o más reticulantes. Los reticulantes son reactivos que tienen extremos reactivos con grupos funcionales específicos (por ejemplo, aminas primarias o sulfhidrilos) en proteínas u otras moléculas. Los reticulantes pueden unir dos o más moléculas mediante un enlace covalente. Los reticulantes incluyen, pero no se limitan a, reticulantes de amina a amina (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo (DSS)), reticulantes de amina a sulfhidrilo (por ejemplo, éster de N- γ -maleimidobutiriloxisuccinimida (GMBS)), reticulantes de carboxilo a amina (por ejemplo, dicitlohexilcarbodiimida (DCC)), reticulantes de sulfhidrilo a carbohidrato (por ejemplo, hidrazida del ácido N- β -maleimidopropiónico (BMPH)), reticulantes de sulfhidrilo a sulfhidrilo (por ejemplo, 1,4-bismaleimidobutano (BMB)), reticulantes fotorreactivos (por ejemplo, N-5-azido-2-nitrobenziloisuccinimida (ANB-NOS)), reticulantes de unión quimioselectiva (por ejemplo, NHS-PEG4-Azida).

35 B. Ácidos nucleicos

Otro aspecto de esta descripción presenta un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido o proteína descritos anteriormente. Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de una sola hebra o de doble hebra, pero preferentemente es ADN de doble hebra.

45 Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de ningún ácido nucleico natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico natural. Por lo tanto, el término cubre, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico natural pero que no está flanqueado por ambas secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se produce naturalmente; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionota o eucariota de manera que la molécula resultante no sea idéntica a ningún vector o ADN genómico natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. El ácido nucleico descrito anteriormente puede usarse para expresar el polipéptido o proteína de fusión de esta invención. Para este propósito, se puede unir operativamente el ácido nucleico a secuencias reguladoras adecuadas para generar un vector de expresión.

55 Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos descritas en la presente descripción se muestran mediante el uso de abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos y código de una letra para aminoácidos. Se muestra solamente una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria se incluye mediante cualquier referencia a la hebra que se muestra.

60 Esta descripción también incluye vectores que contienen una secuencia codificante del inmunógeno descrito, células huésped que contienen los vectores y métodos para preparar un inmunógeno sustancialmente puro que comprende las etapas de introducir la secuencia codificante del inmunógeno en una célula huésped y cultivar la célula huésped en condiciones apropiadas de manera que el inmunógeno se produce y se secreta. El inmunógeno así producido puede recolectarse de maneras convencionales. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a métodos para expresar el inmunógeno y equivalentes biológicos descritos en la presente descripción, ensayos que emplean estos productos génicos y células huésped recombinantes que comprenden constructos de ADN que expresan estas proteínas receptoras.

Los inmunógenos descritos pueden expresarse de forma recombinante mediante clonación molecular del ácido nucleico que codifica los inmunógenos en un vector de expresión (tal como pcDNA3.neo, pcDNA3.1, pCR2.1, pBlueBacHis2 o pLITMUS28) que contiene un promotor adecuado y otros elementos reguladores de la transcripción apropiados y transferirse a células huésped procariotas o eucariotas para producir los inmunógenos. Las técnicas para tales manipulaciones se pueden encontrar descritas en Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, se conocen bien y están fácilmente disponibles para el experto en la técnica. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención incluye células huésped que se han manipulado de manera que contengan y/o expresen secuencias de ADN que codifican los inmunógenos. Tales células huésped recombinantes pueden cultivarse en condiciones adecuadas para producir los inmunógenos descritos o una forma biológicamente equivalente. Las células huésped recombinantes pueden ser procariotas o eucariotas, que incluyen pero sin limitarse a, bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levaduras, células de mamífero que incluyen pero sin limitarse a, líneas celulares de origen humano, bovino, porcino, de mono y roedor, y células de insecto que incluyen pero sin limitarse a, líneas celulares derivadas de *Drosophila* y gusanos de seda.

Por ejemplo, un sistema de expresión de insectos utiliza células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf21) (Invitrogen) junto con un vector de expresión de baculovirus (pAcG2T, Pharmingen). Además, las especies de mamíferos que pueden ser adecuadas y que están disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, células L L-M(TK~) (ATCC CCL 1.3), células L L-M (ATCC CCL 1.2), Saos-2 (ATCC HTB- 85), 293 (ATCC CRL 1573), Raji (ATCC CCL 86), CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26), MRC-5 (ATCC CCL 171) y CPAE (ATCC CCL 209).

Una variedad de vectores de expresión en mamífero puede usarse para expresar inmunógenos recombinantes en células de mamífero. Los vectores de expresión se definen en la presente descripción como secuencias de ADN que se requieren para la transcripción de ADN clonado y la traducción de sus ARNm en un huésped apropiado. Tales vectores pueden usarse para expresar ADN eucariota en una variedad de huéspedes tales como bacterias, algas verdiazules, células vegetales, células de insecto y células animales. Los vectores específicamente diseñados permiten el transporte de ADN entre huéspedes tales como las células de bacteria-levadura o bacteria-animal. Un vector de expresión construido apropiadamente debe contener: un origen de replicación para la replicación autónoma en células huésped, marcadores de selección, un número limitado de sitios de enzimas de restricción útiles, un potencial para un número elevado de copias y promotores activos. Un promotor se define como una secuencia de ADN que dirige la unión de la ARN polimerasa al ADN y el inicio de la síntesis de ARN. Un promotor fuerte es aquel que causa que los ARNm se inicien con alta frecuencia.

Los vectores de expresión pueden incluir, pero no se limitan a, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, plásmidos o virus diseñados específicamente. Los vectores de expresión en mamífero disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión de inmunógenos incluyen, pero no se limitan a, pIRES-hyg (Clontech), pIRES-puro (Clontech), pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCIneo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 y pLITMUS39 (New England Bioloabs), pcDNA1, pcDNA1amp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXTI (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-I(8-2) (ATCC 37110), pDBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) y 1ZD35 (ATCC 37565).

Además, puede usarse una variedad de vectores de expresión bacterianos para expresar los inmunógenos descritos en células bacterianas. Los vectores de expresión bacterianos disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión de inmunógenos incluyen, pero no se limitan a, pCR2.1 (Invitrogen), pETI la (Novagen), lambda gtl 1 (Invitrogen) y pKK223-3 (Pharmacia).

Además, puede usarse una variedad de vectores de expresión en células fúngicas para expresar los inmunógenos en células fúngicas. Los vectores de expresión en células fúngicas disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión de inmunógenos recombinantes incluyen, pero no se limitan a, pYES2 (Invitrogen) y el vector de expresión en *Pichia* (Invitrogen).

Además, puede usarse una variedad de vectores de expresión en células de insecto para expresar un receptor recombinante en células de insecto. Los vectores de expresión en células de insecto disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para la expresión recombinante de los inmunógenos incluyen, pero no se limitan a, pBlueBacIII y pBlueBacHis2 (Invitrogen) y pAcG2T (Pharmingen).

El vector de expresión puede introducirse en células huésped por medio de cualquiera de una serie de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, transformación, transfección, fusión de protoplastos y electroporación. Se pretende que la transformación abarque un cambio genético en la célula objetivo resultante de la incorporación de ADN. Se pretende que la transfección incluya cualquier método conocido en la técnica para introducir los inmunógenos en las células de prueba. Por ejemplo, la transfección incluye transfección mediada por fosfato de calcio o cloruro de calcio, lipofección, electroporación, así como también infección con, por ejemplo, un vector viral tal como un vector retroviral recombinante que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica los inmunógenos y sus combinaciones. Las células que

contienen el vector de expresión se analizan individualmente para determinar si producen los inmunógenos. La identificación de células que expresan inmunógenos se puede realizar mediante varios medios que incluyen, pero sin limitarse a, reactividad inmunológica con bNAb específicos, unión a ligando etiquetado y la presencia de actividad asociada a la célula huésped con respecto a los inmunógenos.

También está dentro del alcance de esta invención una célula huésped que contiene el ácido nucleico descrito anteriormente. Los ejemplos incluyen células bacterianas (por ejemplo, células de *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, mediante el uso de vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Ver, por ejemplo, Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. Para producir un polipéptido de esta invención, se puede cultivar una célula huésped en un medio en condiciones que permitan la expresión del polipéptido codificado por un ácido nucleico de esta invención, y purificar el polipéptido a partir de la célula cultivada o del medio de la célula. Alternativamente, el ácido nucleico de esta invención puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, mediante el uso de secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

C. Composiciones

En otro aspecto, esta descripción proporciona una composición inmunogénica para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita. La composición inmunogénica incluye (i) el inmunógeno, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente; y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable. El método puede incluir además administrar la composición dos o más veces. La administración de la composición puede dar como resultado un mayor número de anticuerpos ampliamente neutralizantes en el suero que pueden reconocer un epítipo de glicano V3.

Una composición inmunogénica es una composición que comprende un péptido inmunogénico que induce una respuesta de CTL medible contra un virus que expresa el péptido inmunogénico, o induce una respuesta de células B medible (tal como producción de anticuerpos) contra el péptido inmunogénico. En un ejemplo, una "composición inmunogénica" es una composición que incluye un inmunógeno descrito derivado de una gp120 o un fragmento antigénico de la misma. Se refiere además a ácidos nucleicos aislados que codifican un inmunógeno, tal como un ácido nucleico que puede usarse para expresar el inmunógeno (y por lo tanto usarse para provocar una respuesta inmunitaria contra este polipéptido).

Para su uso *in vitro*, una composición inmunogénica puede consistir en la proteína aislada, el epítipo peptídico o el ácido nucleico que codifica la proteína o el epítipo peptídico. Para su uso *in vivo*, la composición inmunogénica incluirá típicamente la proteína, el péptido inmunogénico o el ácido nucleico en portadores farmacéuticamente aceptables y/u otros agentes. Cualquier péptido particular, tal como un inmunógeno descrito o un ácido nucleico que codifica el inmunógeno, puede analizarse fácilmente para determinar su capacidad de inducir una respuesta de CTL o células B mediante ensayos reconocidos en la técnica. Las composiciones inmunogénicas pueden incluir adyuvantes, que los expertos en la técnica conocen bien.

Una composición inyectable estéril puede ser una solución o suspensión en un diluyente o solvente no tóxico aceptable parenteralmente. Tales soluciones incluyen, pero no se limitan a, 1,3-butanodiol, manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como pero sin limitarse a, el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como, pero sin limitarse a, aceite de oliva o aceite de ricino, versiones polioxiethyladas de los mismos. Estas soluciones o suspensiones oleosas pueden contener además un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como, pero sin limitarse a, carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. Además pueden usarse otros surfactantes comúnmente usados tales como, pero sin limitarse a, TWEENS o SPANS u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas, o de otro tipo farmacéuticamente aceptables para el propósito de formulación.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma farmacéutica aceptable por vía oral que incluye cápsulas, comprimidos, emulsiones, y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos, los portadores usados comúnmente incluyen, pero no se limitan a, lactosa y almidón de maíz. Típicamente también se añaden agentes lubricantes, tales como, pero sin limitarse a, estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen, pero no se limitan a, lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones acuosas o emulsiones se administran oralmente, el ingrediente activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, cierto agente edulcorante, saborizante o colorante puede añadirse también.

Las composiciones farmacéuticas para administración tópica de acuerdo con la invención descrita pueden formularse como soluciones, pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites. Alternativamente, las formulaciones tópicas pueden tener forma de parches o apósitos impregnados con ingrediente(s) activo(s), que opcionalmente pueden comprender uno o más excipientes o diluyentes. En algunas

modalidades preferidas, las formulaciones tópicas incluyen un material que mejoraría la absorción o penetración del(de los) agente(s) activo(s) a través de la piel u otras áreas afectadas. La composición tópica es útil para tratar trastornos inflamatorios de la piel, que incluyen, pero sin limitarse a, eccema, acné, rosácea, psoriasis, dermatitis de contacto y reacciones a la hiedra venenosa.

Una composición tópica contiene una cantidad segura y eficaz de un portador dermatológicamente aceptable adecuado para su aplicación a la piel. Una composición o componente "cosméticamente aceptable" o "dermatológicamente aceptable" se refiere a una composición o componente que es adecuado para su uso en contacto con la piel humana sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica indebidas y similares. El portador permite que un agente activo y un componente opcional se suministren a la piel a una(s) concentración(ones) apropiada(s). Por lo tanto, el portador puede actuar como diluyente, dispersante, solvente o similar para garantizar que los materiales activos se apliquen y distribuyan uniformemente sobre el objetivo seleccionado a una concentración apropiada. El portador puede ser sólido, semisólido o líquido. El portador puede tener forma de una loción, una crema o un gel, en particular uno que tenga un espesor o límite elástico suficiente para prevenir que los materiales activos sedimenten. El portador puede ser inerte o poseer beneficios dermatológicos. También debe ser física y químicamente compatible con los componentes activos descritos en la presente descripción y no debe perjudicar indebidamente la estabilidad, eficacia u otros beneficios de uso asociados con la composición. La composición tópica puede ser un producto cosmético o dermatológico en la forma conocida en la técnica para aplicaciones tópicas o transdérmicas, que incluyen soluciones, aerosoles, cremas, geles, parches, pomadas, loción o espuma.

Portador farmacéuticamente aceptable incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retardan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Un "portador farmacéuticamente aceptable", después de administrarse a un sujeto o sobre él, no causa efectos fisiológicos indeseables. El portador en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" también en el sentido de que sea compatible con el ingrediente activo y pueda estabilizarla. Uno o más agentes solubilizantes pueden utilizarse como portadores farmacéuticos para el suministro de un agente activo. Los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes biocompatibles para lograr una composición que pueda usarse como forma farmacéutica. Los ejemplos de otros portadores incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa y lauril sulfato de sodio. En Remington's Pharmaceutical Sciences se describen portadores y diluyentes farmacéuticos adecuados adicionales, así como también las necesidades farmacéuticas para su uso. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Los compuestos terapéuticos pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (ver, por ejemplo, Berge, S. M., y otros (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

Las células huésped proporcionadas en las composiciones inmunogénicas pueden ser una vacuna bacteriana inactivada o atenuada químicamente/genéticamente que no provoca la respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos (CTL) necesaria para la lisis de células tumorales y células infectadas con patógenos intracelulares.

II. Métodos para estimular la respuesta inmunitaria mediante el uso de los inmunógenos descritos

Los inmunógenos, como se describen en la presente descripción, una molécula de ácido nucleico que codifica el inmunógeno descrito, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus pueden administrarse a un sujeto para generar una respuesta inmunitaria a un patógeno, tal como VIH. En otro aspecto, esta descripción proporciona un método para tratar o prevenir la infección por VIH en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunógeno, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente, o una de sus combinaciones. Esta descripción también proporciona el uso del inmunógeno, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente, o una de sus combinaciones en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la infección por VIH en un sujeto.

En aplicaciones ilustrativas, las composiciones se administran a un sujeto que padece una infección por VIH o en riesgo de infectarse por VIH. En otras aplicaciones, los inmunógenos descritos en la presente descripción pueden administrarse de forma profiláctica, por ejemplo, como parte de un régimen de inmunización.

El inmunógeno se administra en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria contra el virus VIH. La administración induce una respuesta inmunitaria suficiente para tratar la infección patógena, por ejemplo, para inhibir la infección y/o reducir los signos y/o síntomas de la infección. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad, el estado general de salud del sujeto y la fortaleza del sistema inmunitario del sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunógeno es aquella que proporciona ya sea alivio subjetivo de un(os) síntoma(s) o una mejoría objetivamente identificable percibida por el clínico u otros observadores calificados.

Cantidad terapéuticamente eficaz o cantidad eficaz se refiere a la cantidad de agentes, tales como vacuna de ácido

nucleico u otros agentes terapéuticos, que es suficiente para prevenir, tratar (incluida la profilaxis), reducir y/o aliviar los síntomas y/o las causas subyacentes de cualquiera de un trastorno o enfermedad, por ejemplo para prevenir, inhibir y/o tratar el VIH. En algunas modalidades, una "cantidad eficaz" es suficiente para reducir o eliminar un síntoma de una enfermedad, tal como el SIDA. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad necesaria para inhibir la replicación viral o para alterar de manera medible los síntomas externos de la infección viral, tal como un aumento del recuento de células T en el caso de la infección por VIH-1. En general, esta cantidad será suficiente para inhibir de manera medible la replicación o infectividad del virus (por ejemplo, VIH). Cuando se administra a un sujeto, generalmente se usará una dosis que logrará concentraciones tisulares objetivo (por ejemplo, en linfocitos) que se ha demostrado que logran la inhibición de la replicación viral *in vitro*.

Un inmunógeno puede administrarse por cualquier medio conocido por un experto en la técnica (ver Banga, A., "Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins", en Therapeutic Peptides and Proteins, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1995) ya sea local o sistémicamente, tal como mediante inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa, pero incluso se contempla la administración oral, nasal o anal. En una modalidad, la administración es mediante inyección subcutánea o intramuscular. Para extender el tiempo durante el cual el inmunógeno descrito está disponible para estimular una respuesta, el inmunógeno puede proporcionarse como un implante, una inyección oleosa o como un sistema de partículas. El sistema de partículas puede ser una micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanocápsula o una partícula similar (ver, por ejemplo, Banga, supra). Se ha demostrado que un portador en partículas basado en un polímero sintético actúa como un adyuvante para mejorar la respuesta inmunitaria, además de proporcionar una liberación controlada. Las sales de aluminio también pueden usarse como adyuvantes para producir una respuesta inmunitaria.

Opcionalmente, una o más citocinas, tales como interleucina (IL)-2, IL-6, IL-12, IL-15, RANTES, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF) - α , interferón (IFN)- α o IFN- γ , uno o más factores de crecimiento, tales como GM-CSF o G-CSF, una o más moléculas coestimuladoras, tales como ICAM-1, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2 u otras moléculas relacionadas con B7; una o más moléculas tales como OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas, pueden usarse como adyuvantes biológicos (ver, por ejemplo, Salgaller y otros, 1998, J. Surg. Oncol. 68(2): 122-38; Lotze y otros, 2000, Cancer J Sci. Am. 6 (Supl 1): S61-6; Cao y otros, 1998, Stem Cells 16 (Supl 1 J.-251-60; Kuiper y otros, 2000, Adv. Exp. Med. Biol. 465:381-90). Estas moléculas pueden administrarse sistémicamente (o localmente) al huésped. En varios ejemplos, se administran IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, B7-1 B.7-2, OX-40L, 41 BBL e ICAM-1.

Se proporciona una composición farmacéutica que incluye un inmunógeno aislado. En algunas modalidades, el inmunógeno se mezcla con un adyuvante que contiene dos o más de un detergente estabilizante, un agente formador de micelas y un aceite. Los detergentes estabilizantes, agentes formadores de micelas y aceites adecuados se detallan en la patente de Estados Unidos núm. 5,585,103; la patente de Estados Unidos núm. 5,709,860; la patente de Estados Unidos núm. 5,270,202; y la patente de Estados Unidos núm. 5,695,770. Un detergente estabilizante es cualquier detergente que permite que los componentes de la emulsión permanezcan como una emulsión estable. Tales detergentes incluyen polisorbato, 80 (TWEEN) (sorbitán-mono-9-octadecenoato-poli(oxi-1,2-etanodiol); fabricado por ICI Americas, Wilmington, DE), TWEEN 40™, TWEEN 20™, TWEEN 60™, ZWITTERGENT™ 3-12, TEEPOL HB7™ y SPAN 85™. Estos detergentes normalmente se proporcionan en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 0,5 %, tal como aproximadamente 0,2 %. Un agente formador de micelas es un agente que puede estabilizar la emulsión formada con los otros componentes de manera que se forme una estructura similar a una micela. Estos agentes generalmente causan cierta irritación en el sitio de inyección para reclutar macrófagos para mejorar la respuesta celular. Ejemplos de tales agentes incluyen surfactantes poliméricos descritos en publicaciones de BASF Wyandotte, por ejemplo, Schmolka, J. Am. Oil. Chem. Soc. 54: 110, 1977, y Hunter y otros, J. Immunol 129: 1244, 1981, PLURONIC™ L62LF, L101, y L64, PEG1000, y TETRONIC™ 1501, 150R1, 701, 901, 1301 y 130R1. Las estructuras químicas de tales agentes se conocen bien en la técnica. En una modalidad, el agente se elige de modo que tenga un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de entre 0 y 2, como lo definen Hunter y Bennett, J. Immun. 133:3167, 1984. El agente puede proporcionarse en una cantidad eficaz, por ejemplo entre 0,5 y 10 %, o en una cantidad entre 1,25 y 5 %.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada pueden producirse como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas de partículas. Para obtener una descripción general amplia de los sistemas de suministro de proteínas, ver Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, 1995. Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Partículas, microesferas y microcápsulas más pequeñas que aproximadamente 1 μm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 μm de manera que solo las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Las micropartículas tienen típicamente alrededor de 100 μm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular (ver Kreuter, Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, pp. 219-342, 1994; y Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, pp. 315-339, 1992).

Pueden usarse polímeros para la liberación controlada de iones. Varias matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en el suministro controlado de fármacos se conocen en la técnica (Langer, Accounts Chem.

Res. 26:53', 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, poloxámero 407 existe como un líquido viscoso aunque móvil a temperaturas bajas pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Ha demostrado ser un vehículo eficaz para la formulación y el suministro sostenido de interleucina-2 y ureasa recombinantes (Johnston y otros, Pharm. Res. 9:425,1992; y Pec, *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58, 1990). Alternativamente, se ha usado hidroxipatita como un microportador para la liberación controlada de proteínas (Ijntema y otros, *Int. J. Pharm.* 112:215, 1994). En otro aspecto más, los liposomas se usan para la liberación controlada, así como también para el direccionamiento farmacológico del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri y otros, *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993). Se conocen numerosos sistemas adicionales para el suministro controlado de proteínas terapéuticas (por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 5,055,303; patente de Estados Unidos núm. 5,188,837; patente de Estados Unidos núm. 4,235,871; patente de Estados Unidos núm. 4,501,728; patente de Estados Unidos núm. 4,837,028; patente de Estados Unidos núm. 4,957,735; y patente de Estados Unidos núm. 5,019,369; patente de Estados Unidos núm. 5,055,303; patente de Estados Unidos núm. 5,514,670; patente de Estados Unidos núm. 5,413,797; patente de Estados Unidos núm. 5,268,164; patente de Estados Unidos núm. 5,004,697; patente de Estados Unidos núm. 4,902,505; patente de Estados Unidos núm. 5,506,206; patente de Estados Unidos núm. 5,271,961; patente de Estados Unidos núm. 5,254,342; y patente de Estados Unidos núm. 5,534,496).

En otra modalidad, una composición farmacéutica incluye un ácido nucleico que codifica un inmunógeno descrito. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico a un sujeto para generar una respuesta inmunitaria. En un ejemplo específico, no limitante, se administra a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico que codifica un inmunógeno gp120 descrito o un fragmento inmunogénico del mismo para tratar, prevenir o inhibir la infección por VIH.

Opcionalmente, puede usarse una o más citocinas, tales como IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- α o IFN- γ , uno o más factores de crecimiento, tales como GM-CSF o G-CSF, una o más moléculas coestimuladoras, tales como ICAM-1, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2 u otras moléculas relacionadas con B7; una o más moléculas tales como OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas, como adyuvantes biológicos (ver, por ejemplo, Salgaller y otros, 1998, *J. Surg. Oncol.* 68(2): 122-38; Lotze y otros, 2000, *Cancer J Sci. Am.* 6(Supl 1):S61 -6; Cao y otros, 1998, *Stem Cells* 16(Supl 1):251- 60; Kuiper y otros, 2000, *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:381-90). Estas moléculas pueden administrarse sistémicamente al huésped. Se debe señalar que estas moléculas se pueden coadministrar por medio de la inserción de un ácido nucleico que codifica las moléculas en un vector, por ejemplo, un vector pox recombinante (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,045,802). En varias modalidades, el ácido nucleico que codifica el adyuvante biológico se puede clonar en el mismo vector que la secuencia codificante del inmunógeno descrito, o el ácido nucleico se puede clonar en uno o más vectores separados para su coadministración. Además, se pueden coadministrar factores inmunomoduladores inespecíficos tales como el bacilo Calmette-Guérin (BCG) y el levamisol. Un enfoque para la administración de ácidos nucleicos es la inmunización directa con ADN plasmídico, tal como con un plásmido de expresión en mamífero. Como se describió anteriormente, la secuencia de nucleótidos que codifica el inmunógeno descrito se puede colocar bajo el control de un promotor para aumentar la expresión de la molécula.

La inmunización mediante constructos de ácido nucleico se conoce bien en la técnica y se enseña, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 5,643,578 (que describe métodos para inmunizar vertebrados mediante la introducción de ADN que codifica un inmunógeno deseado para provocar una respuesta mediada por células o una humoral), y la patente de Estados Unidos núm. 5,593,972 y la patente de Estados Unidos núm. 5,817,637 (que describen la unión operativa de una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno a secuencias reguladoras que permiten la expresión). La patente de Estados Unidos núm. 5,880,103 describe varios métodos de suministro de ácidos nucleicos que codifican péptidos inmunogénicos u otros antígenos a un organismo. Los métodos incluyen el suministro liposomal de los ácidos nucleicos (o de los propios péptidos sintéticos) y constructos inmunoestimulantes, o ISCOMSTM, estructuras similares a jaula cargadas negativamente de 30-40 nm de tamaño que se forman espontáneamente al mezclar colesterol y Quil ATM (saponina). Se ha generado inmunidad protectora en una variedad de modelos experimentales de infección, que incluyen toxoplasmosis y tumores inducidos por el virus de Epstein-Barr, mediante el uso de ISCOMSTM como vehículo de suministro de antígenos (Mowat y Donachie, *Immunol. Today* 12:383, 1991). Se ha descubierto que dosis de antígeno tan bajas como 1 μ g encapsulado en ISCOMSTM producen respuestas de CTL mediadas por Clase I (Takahashi y otros, *Nature* 344:873, 1990).

En otro enfoque para usar ácidos nucleicos para inmunización, un inmunógeno descrito también puede expresarse mediante huéspedes o vectores virales atenuados o vectores bacterianos. Pueden usarse virus vaccinia, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes, retrovirus, citomegalovirus recombinantes u otros vectores virales para expresar el péptido o proteína, de esta manera se provoca una respuesta de CTL. Por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 4,722,848 se describen vectores de vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización. El BCG (Bacillus Calmette Guerin) proporciona otro vector para la expresión de los péptidos (ver Stover, *Nature* 351:456-460, 1991).

En una modalidad, un ácido nucleico que codifica un inmunógeno descrito se introduce directamente en las células. Por ejemplo, el ácido nucleico puede cargarse en microesferas de oro mediante métodos estándar e introducirse en la piel mediante un dispositivo tal como la pistola de genes HELIOSTM de Bio-Rad. Los ácidos nucleicos pueden estar "desnudos", y consistir en plásmidos bajo el control de un promotor fuerte. Típicamente, el ADN se inyecta en el

músculo, aunque también puede inyectarse directamente en otros sitios, que incluyen los tejidos cercanos a las metástasis. Las dosis para inyección normalmente son de aproximadamente 0,5 g/kg a aproximadamente 50 mg/kg, y típicamente son de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg (ver, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 5,589,466).

Administraciones únicas o múltiples de las composiciones se administran en dependencia de la dosis y la frecuencia según lo requiera y tolere el sujeto. En una modalidad, la dosis se administra una vez como un bolo, pero en otra modalidad puede aplicarse periódicamente hasta que se logre un resultado terapéutico. Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o aliviar los síntomas o signos de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al sujeto. Puede utilizarse administración sistémica o local.

Puede ser ventajoso administrar las composiciones inmunogénicas descritas en la presente descripción con otros agentes tales como proteínas, péptidos, anticuerpos y otros agentes antivirales, tales como agentes anti-VIH. Ejemplos de tales agentes terapéuticos anti-VIH incluyen inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, tales como abacavir, AZT, didanosina, emtricitabina, lamivudina, estavudina, tenofovir, zalcitabina, zidovudina y similares, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa, tales como delavirdina, efavirenz, nevirapina, inhibidores de proteasa tales como amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, fosamprenavir, ritonavir, saquinavir, tipranavir y similares, e inhibidores de proteínas de fusión tales como enfuvirtida y similares. En ciertas modalidades, las composiciones inmunogénicas se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos anti-VIH. En algunos ejemplos, los inmunógenos descritos se administran con células T colaboradoras, tales como células T colaboradoras exógenas. Se pueden encontrar métodos ilustrativos para producir y administrar células T colaboradoras en la publicación de patente internacional WO 03/020904. En ciertas modalidades, las composiciones inmunogénicas se administran secuencialmente con otros agentes terapéuticos anti-VIH, tal como antes o después del otro agente. Un experto en la técnica sabría que la administración secuencial puede significar inmediatamente después o después de un período de tiempo apropiado, tal como horas, días, semanas, meses o incluso años después.

El inmunógeno gp120 descrito o fragmentos inmunogénicos del mismo y los ácidos nucleicos que codifican estos inmunógenos pueden usarse en un régimen de inmunización de múltiples etapas. En algunos ejemplos, el régimen incluye administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer inmunógeno o fragmentos inmunogénicos del mismo como se describe en la presente descripción (la sensibilización) y reforzar la respuesta inmunogénica con uno o más inmunógenos o fragmentos inmunogénicos adicionales del mismo después de un período de tiempo apropiado. El método para provocar una reacción inmunitaria de este tipo es lo que se conoce como "sensibilización-refuerzo". En este método, la respuesta de anticuerpos a la superficie inmunogénica seleccionada se enfoca al darle al sistema inmunitario del sujeto la oportunidad de "ver" la superficie antigénica en múltiples contextos. En otras palabras, el uso de múltiples inmunógenos o fragmentos inmunogénicos de los mismos con una superficie antigénica en común selecciona anticuerpos que se unen a la superficie del inmunógeno en común.

En algunos ejemplos, los inmunógenos o fragmentos inmunogénicos de los mismos y los ácidos nucleicos que codifican estos inmunógenos pueden administrarse en regímenes de inmunización de "sensibilización-refuerzo". Por ejemplo, los inmunógenos o fragmentos inmunogénicos de los mismos y los ácidos nucleicos que codifican estos inmunógenos pueden administrarse a un sujeto, antes, durante y después de administrar un trómero gp140 estabilizado (ver, por ejemplo, Yang y otros J Virol. 76(9):4634-42, 2002).

También pueden usarse cócteles que contengan los agentes inmunogénicos descritos, por ejemplo, el inmunógeno, el ácido nucleico que codifica el inmunógeno, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente, o una de sus combinaciones para sensibilizar y luego reforzar con trómeros de una variedad de cepas de VIH diferentes o con trómeros que son una mezcla de múltiples cepas de VIH. La sensibilización puede administrarse como una dosis única o dosis múltiples, por ejemplo, pueden administrarse dos dosis, tres dosis, cuatro dosis, cinco dosis, seis dosis o más a un sujeto durante días, semanas o meses. El refuerzo puede administrarse como una dosis única o dosis múltiples, por ejemplo, pueden administrarse de dos a seis dosis o más a un sujeto durante un día, una semana o meses. También pueden administrarse múltiples refuerzos, tales como de uno a cinco o más. Pueden usarse diferentes dosis en una serie de inoculaciones secuenciales. Por ejemplo, una dosis relativamente grande en una inoculación primaria y luego un refuerzo con dosis relativamente más pequeñas. La respuesta inmunitaria contra la superficie antigénica seleccionada puede generarse mediante una o más inoculaciones de un sujeto con una composición inmunogénica descrita en la presente descripción.

III. Reactivos y kits de inmunodiagnóstico

Esta descripción proporciona un método para detectar o aislar un anticuerpo de unión al VIH-1 en un sujeto infectado con VIH-1. El método incluye poner en contacto una muestra de un sujeto, tal como, pero sin limitarse a, una muestra de sangre, suero, plasma, orina o esputo del sujeto con uno o más de los agentes inmunogénicos descritos, por ejemplo, el inmunógeno, el ácido nucleico que codifica el inmunógeno, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus descritos anteriormente, o una de sus combinaciones. El método también puede incluir detectar la unión de anticuerpos en la muestra a los agentes inmunogénicos descritos. La unión puede detectarse mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica, que incluye el uso de anticuerpos secundarios etiquetados que

se unen específicamente a los anticuerpos de la muestra. Las etiquetas incluyen radioetiquetas, etiquetas enzimáticas y etiquetas fluorescentes. En algunas modalidades, el método puede incluir además aislar el anticuerpo de unión al VIH-1 en un sujeto.

5 Los agentes inmunogénicos descritos pueden ser componentes de un kit. Un kit de este tipo también puede incluir componentes adicionales que incluyen empaque, instrucciones y otros reactivos varios, tales como tampones, sustratos, anticuerpos o ligandos, tales como anticuerpos o ligandos de control, y reactivos de detección. El kit puede incluir opcionalmente un adyuvante.

10 Un adyuvante es un vehículo usado para mejorar la antigenicidad. Los adyuvantes incluyen una suspensión de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato) en los que se adsorbe el antígeno; o emulsión de agua en aceite en la que la solución de antígeno se emulsiona en aceite mineral (adyuvante incompleto de Freund), a veces con la inclusión de micobacterias muertas (adyuvante completo de Freund) para mejorar aún más la antigenicidad (inhibe la degradación de antígeno y/o causa la entrada de macrófagos). Los oligonucleótidos inmunoestimuladores (tales como
15 aquellos que incluyen un motivo CpG) también pueden usarse como adyuvantes (por ejemplo, ver la patente de Estados Unidos núm. 6,194,388; la patente de Estados Unidos núm. 6,207,646; la patente de Estados Unidos núm. 6,214,806; la patente de Estados Unidos núm. 6,218,371; la patente de Estados Unidos núm. 6,239,116; la patente de Estados Unidos núm. 6,339,068; la patente de Estados Unidos núm. 6,406,705; y la patente de Estados Unidos núm. 6,429,199). Los adyuvantes incluyen moléculas biológicas (un "adyuvante biológico"), tales como moléculas
20 coestimuladoras. Los adyuvantes ilustrativos incluyen IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L y 41 BBL. Pueden usarse adyuvantes en combinación con los inmunógenos descritos.

IV. Definiciones

25 Como se usa en este documento, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluye las referencias al plural a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí.

30 El término "y/o" significa uno cualquiera de los elementos, cualquier combinación de los elementos, o todos los elementos con los que se asocia este término.

35 Las composiciones de la presente invención pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en los ingredientes reivindicados. Las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como, "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluyen"), o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivos o de extremo abierto y no excluyen elementos no mencionados o etapas del método adicionales.

40 El término "que trata" o "tratamiento" se refiere a la administración de un compuesto o agente a un sujeto que tiene un trastorno o está en riesgo de desarrollar el trastorno con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, retrasar la aparición de, prevenir o aliviar el trastorno, el síntoma del trastorno, el estado patológico secundario al trastorno o la predisposición hacia el trastorno.

45 Los términos "prevenir", "que previene", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto, que no lo tiene, pero que está en riesgo o es susceptible a desarrollar un trastorno o afección.

50 El término "sujeto" se refiere a un ser humano y un animal no humano. Los ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como mamíferos no humanos, primates no humanos (particularmente primates superiores), perro, roedor (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, gato y conejo, y no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una modalidad, el sujeto es un ser humano. En otra modalidad, el sujeto es un animal experimental, animal no humano o animal adecuado como modelo de enfermedad.

55 Como se describe en la presente descripción, se proporcionan una serie de intervalos de valores. Se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado se abarca dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada
60 intervalo donde se incluyen cualquiera, ninguno o ambos límites en los intervalos más pequeños también se abarca dentro de la invención, sometido a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Donde el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

65 El término "aproximadamente" generalmente se refiere a más o menos el 10 % del número indicado. Por ejemplo, "aproximadamente 10 %" puede indicar un intervalo de 9 % a 11 %, y "aproximadamente 1" puede significar de 0,9-

1, 1. Otros significados de "aproximadamente" pueden resultar evidentes a partir del contexto, tal como el de redondeo, por lo que, por ejemplo, "aproximadamente 1" también puede significar entre 0,5 y 1,4.

La gp120 es una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los polipéptidos maduros de gp120 de tipo salvaje tienen aproximadamente 500 aminoácidos en la secuencia primaria. La gp120 está fuertemente N-glicosilada lo que da lugar a un peso molecular aparente de 120 kD. El polipéptido está compuesto por cinco regiones conservadas (C1-C5) y cinco regiones de alta variabilidad (V1-V5). Se muestran secuencias ilustrativas de polipéptidos gp160 de tipo salvaje en GENBANK®, por ejemplo, con los núm. de acceso AAB05604 y AAD12142 disponibles el 29 de junio de 2010. Se muestran secuencias ilustrativas de polipéptidos gp120 de VIH-1 DU156 en GENBANK®, por ejemplo, con los núm. de acceso ABD83635, AAO50350 y AAT91997, disponibles el 27 de septiembre de 2010. Se muestran secuencias ilustrativas de polipéptidos gp120 de VIH-1 ZA012 en GENBANK®, por ejemplo, con los núm. de acceso ACF75939, disponibles el 27 de septiembre de 2010.

"Sitio de glicosilación" se refiere a una secuencia de aminoácidos en la superficie de un polipéptido, tal como una proteína, que aloja la unión de un glicano. Un sitio de glicosilación por enlace a N es una secuencia triplete de NXS/T en la que N es asparagina, X es cualquier residuo excepto prolina, S/T significa serina o treonina. Un glicano es un polisacárido u oligosacárido. También puede usarse glicano para referirse a la porción de carbohidrato de un glicoconjugado, tal como una glicoproteína, un glicolípido o un proteoglicano.

"Polipéptido inmunogénico" se refiere a una proteína o una porción de la misma que puede inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, tal como un mamífero infectado o en riesgo de infección con un patógeno. Administración de un polipéptido inmunogénico derivado de un patógeno de interés que induce una respuesta inmunitaria. La administración de un polipéptido inmunogénico puede conducir a una inmunidad protectora contra un patógeno de interés. En algunos ejemplos, un polipéptido inmunogénico es un antígeno que se remodela para enfocar la inmunogenicidad en un epítipo objetivo. Un "polipéptido gp120 inmunogénico" es una molécula de gp120, una molécula de gp120 remodelada o una porción de la misma capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, tal como un mamífero con o sin infección por VIH. La administración de un polipéptido gp120 inmunogénico que induce una respuesta inmunitaria puede conducir a una inmunidad protectora contra el VIH.

"Respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como una célula B, una célula T o un monocito, a un estímulo. En una modalidad, la respuesta es específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno"). En una modalidad, una respuesta inmunitaria es una respuesta de células T, tal como una respuesta de CD4+ o una respuesta de CD8+. En otra modalidad, la respuesta es una respuesta de células B y da como resultado la producción de anticuerpos específicos.

"Aislado" se refiere a un componente biológico "aislado" (tal como una proteína, por ejemplo, un antígeno descrito o un ácido nucleico que codifica dicho antígeno) que se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en los que el componente se produce naturalmente, tales como otros ADN cromosómicos y extracromosómicos, ARN y proteínas. Las proteínas, péptidos y ácidos nucleicos que se han "aislado" incluyen las proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también incluye proteínas o péptidos preparados mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como también moléculas de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos sintetizadas químicamente. Aislado (o purificado) no requiere pureza absoluta y puede incluir moléculas de proteínas, péptidos o ácidos nucleicos que están al menos 50 %, tal como al menos 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, o incluso el 99,9 % aisladas.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (por ejemplo, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm producido por ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y normalmente se proporciona en listados de secuencias, como la hebra no codificante, usada como plantilla para la transcripción, de un gen o ADNc pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique de cualquier otra manera, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones redundantes entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones. En algunos ejemplos, un ácido nucleico codifica un antígeno descrito. "Ácido nucleico recombinante" se refiere a un ácido nucleico que tiene secuencias de nucleótidos que no están unidas entre sí de forma natural. Esto incluye vectores de ácido nucleico que comprenden un ácido nucleico amplificado o ensamblado que puede usarse para transformar una célula huésped adecuada. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico recombinante se denomina "célula huésped recombinante". Luego, el gen se expresa en la célula huésped recombinante para producir, por ejemplo, un "polipéptido recombinante". Un ácido nucleico recombinante también puede desempeñar una función no codificante (tal como un promotor, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma, etc.).

A menos que se especifique de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se conoce comúnmente por los expertos en la técnica a la que

pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción también pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen ahora.

5 V. Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo describe los materiales y métodos usados en los Ejemplos 2-6 a continuación.

10

Proteínas de la envoltura

Los trímeros de Env se expresaron como trímeros de gp140 solubles similares a los nativos que incluían las sustituciones SOSIP: Sustituciones 'SOS' (A501C_{gp120}, T605C_{gp41}), 'IP' (I559P_{gp41}), adición de la secuencia de glicano unida a N en el residuo 332_{gp120} (T332N_{gp120}), un sitio de escisión gp120-gp41 mejorado (REKR (SEQ ID NO: 17) a RRRRRR (SEQ ID NO: 18)), y un codón de parada después del residuo 664_{gp41} (numeración de Env de acuerdo con la nomenclatura HX). Los trímeros de Env RC1, RC1-4fill, RC1-Avitag, RC1-Spytag, RC1-glicanoKO, RC1-glicanoKO-Avitag, RC1-glicanoKO-GAIA ("GAIA" descrita como SEQ ID NO: 16) y RC1-GAIA ("GAIA" descrito como la SEQ ID NO: 16), wtBG505 y las variantes de BG505 previamente informadas _11MUTB, 10MUT, 7MUT, 5MUT se clonaron en el vector de expresión pPPPI4 mediante el uso de fragmentos de genes sintéticos (Integrated DNA Technologies (IDT)). Las variantes de glicano RC1Δ301, RC1Δ332 y _11MUTBA301 se produjeron mediante mutagénesis dirigida al sitio (kit de mutagénesis dirigida a sitios múltiples QuikChange Lightning, # de catálogo 210515, Agilent Technologies).

15

20

25

Se usaron versiones no etiquetadas de proteínas Env en ELISA (ver la sección ELISA) y para inmunizaciones en ratones de tipo salvaje (ver la sección Animales). La versión con etiqueta Spytag de RC1-4fill se conjugó con partículas similares a virus (VLP) y se usó para inmunizaciones en conejos y macacos (ver las secciones Producción y conjugación de VLP y Animales). Las versiones con etiqueta Avitag de RC1 y RC1-glicanoKO se biotinilaron y usaron como cebos en FACS (ver la sección Citometría de flujo y clasificación de células B individuales).

30

Los trímeros de Env solubles se expresaron mediante transfección transitoria en células HEK293-6E (Consejo Nacional de Investigación de Canadá) o células Expi293 (Life Technologies) y se purificaron a partir de sobrenadantes celulares mediante cromatografía de inmunoafinidad a 2G12 o NIH45-46 y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) como se describió previamente (Wang, H. y otros *Elife* 6 (2017)). Las proteínas se almacenaron a 4 °C en Tris 20 mM, pH 8,0 y cloruro de sodio 150 mM (tampón TBS). Los inmunógenos con etiqueta SpyTag se sometieron a intercambio de tampón en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM.

35

Producción y conjugación de VLP

Para la unión a las VLP, se añadió una secuencia SpyTag C-terminal (13 residuos) a RC1-4fill para formar un enlace isopeptídico irreversible con la proteína SpyCatcher (Zakeri, B. y otros *Proc Natl Acad Sci USA* 109, E690-697 (2012)). El gen que codifica la proteína de cubierta del bacteriófago AP205 al que se unió la proteína SpyCatcher fue un amable regalo del Dr. Mark Howarth, de la Universidad de Oxford). Las VLP SpyCatcher-AP205 se purificaron como se describe (Brune, K. D. y otros *Sci Rep* 6, 19234 (2016)), se incubaron con un exceso molar de 3 veces de trímeros de Env con etiqueta SpyTag RC1-4fill y se separaron las VLP conjugadas de los trímeros de Env libres mediante SEC en una columna Superdex 200 equilibrada con fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. La conjugación de los trímeros de Env se comprobó mediante ME con tinción negativa y/o SDS-PAGE, y las concentraciones de inmunógeno se estimaron mediante la comparación con cantidades conocidas del inmunógeno libre analizado en el mismo gel de SDS-PAGE.

50

Animales

Ratones portadores de los genes *IgV(D)J* que codifican *IgH* e *IgL* de iGL correspondientes a los anticuerpos ampliamente neutralizantes humanos PGT121 y 10-1074 (RATONES CON INSERCIÓN GÉNICA DE GLHL121) se describieron previamente (Escolano, A. y otros *Cell* 166, 1445-1458 e1412, (2016)). Para las inmunizaciones se usaron ratones machos C57BL6 de 6-8 semanas de edad de The Jackson Laboratory. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por la Universidad Rockefeller IACUC. Los ratones con inserción génica de GL_H121 o los ratones machos C57BL6 de tipo salvaje se distribuyeron equitativamente en grupos y se inmunizaron por vía intraperitoneal con 10 pg de trímero de envoltura SOSIP soluble en adyuvante Ribi (Sigma) (1:1).

60

Para la inmunización se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda (Covance) de seis meses de edad. Los conejos se inmunizaron por vía subcutánea con ~22 µg de trímero de Env SOSIP RC1-4fill conjugado con VLP (VLP de RC1-4fill) en un adyuvante de saponina similar a ISCOM (ver la sección Síntesis de adyuvantes). Se recogieron muestras de suero de ratones y conejos en las semanas 0 y 2 después de la inmunización.

65

Ocho macacos rhesus (*Macaco mulatto*) de origen genético indio, de 2 a 4 años de edad, se alojaron y cuidaron de

acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, Informe núm. NIH 82-53 (Departamento de Salud y Servicios Humanos, Bethesda, Maryland, 1985) en una instalación NIH de nivel 2 de bioseguridad. Todos los procedimientos y experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de NIAID, NIH.

Los animales se inmunizaron por vía subcutánea (s.c) con aproximadamente 200 µg de trómero de Env SOSIP RC1-4fill conjugado con VLP (VLP de RC1-4fill) con adyuvante en IscoMPLA en el interior medio de las patas delanteras y las patas traseras (un total de 4 sitios/animal). Se extrajo sangre periódicamente para monitorear la actividad neutralizante del suero y caracterizar la unión de anticuerpos séricos mediante ELISA. Se obtuvieron biopsias de ganglios linfáticos de macacos no expuestos y de macacos inmunizados 3 semanas después de la inmunización.

Síntesis de adyuvante

El adyuvante de saponina similar a ISCOM se preparó como se describió previamente (K. Lövgren-Bengtsson, y otros, en *Methods in Molecular Medicine, Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, D. O'Hagan, Ed. (Humana Press, Totowa, NJ, 2000), vol. 42, pp. 239- 258). Brevemente, se prepararon soluciones de 20 mg/ml de colesterol (Avanti Polar Lipids 700000) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) (Avanti Polar Lipids 850355) en detergente MEGA-10 al 20 % (Sigma D6277). La saponina Quil-A (InvivoGen vacquil) se disolvió en agua Milli-Q a una concentración final de 100 mg/ml. Todos los componentes se mezclaron en una relación de 1:1:5 (col:DPPC:Quil-A) seguido de dilución con PBS 1x para una concentración final de 1 mg/ml de colesterol. Para el adyuvante de saponina ISCOM-MPLA, se preparó una solución a 5 mg/ml de MPLA (Avanti 699800) en MEGA-10 al 20 % y los componentes se mezclaron en una relación de 2:1:1:10 (col: DPPC:MPLA: Quil-A). Se dejó que las soluciones se equilibraran durante la noche a RT, seguido de diálisis contra PBS 1x mediante el uso de una membrana con MWCO de 10k (ThermoFisher 66456). Luego, la solución adyuvante se esterilizó por filtración, se concentró mediante el uso de filtros de centrífuga Centricon con MWCO de 50k (Millipore Sigma UFC905024) y se purificó adicionalmente mediante cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) mediante el uso de una columna de exclusión por tamaño Sephacryl S-500 HR (GE Life Sciences 28-9356-06). La concentración final de adyuvante se determinó mediante cuantificación de colesterol (Sigma MAK043).

ELISA

Los ELISA con trómeros de Env SOSIP_11MUTB, RC1_11MUTBΔ301, RC1Δ301, RC1-GAIA ("GAIA" descrito como la SEQ ID NO: 16), RC1-glicano-desactivación génica (RC1-glicanoKO), RC1-glicanoKO-GAIA ("GAIA" descritos como la SEQ ID NO: 16), RC1Δ332, BG505), 10MUT, 7MUT, 5MUT o el lazo V3-péptido C consenso (SEQ ID NO: 10: KGKGGKGGKGC TRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHC) se realizaron mediante recubrimiento directo de placas de 96 pocillos de alta unión (Corning #9018) con 50 µl por pocillo de solución de proteína a 2 µg/ml en PBS 1x durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (PBS 1x con 0,05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich)) y se incubaron en tampón de bloqueo (PBS 1x con 2 % de leche) durante 1 hora (h) a temperatura ambiente (RT). Inmediatamente después del bloqueo, se añadieron anticuerpos monoclonales o muestras de suero en tampón de bloqueo y se incubaron durante 2 h a RT. Las muestras de suero se analizaron a una dilución inicial de 1:100 o 1:30 y siete diluciones en serie adicionales de 3 veces. Se evaluaron anticuerpos monoclonales (IgG) de ratón y humanos o Fab humanos a las concentraciones especificadas en la sección de Resultados. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y luego se incubaron con anti-IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch #115-035-071), anti-cadena pesada de IgG humana (Jackson ImmunoResearch #109-035-098) o anti-cadena pesada y ligera de Ig humana (Jackson ImmunoResearch #109-036-088) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón de lavado en una dilución 1:5000. Las placas se revelaron mediante la adición del sustrato HRP, solución ABTS Single (Life Technologies #00-2024), y la absorbancia se midió a 405 nm con un lector de microplacas ELISA (FluoStar Omega, BMG Labtech).

En otros ELISA, se recubrieron placas de 96 pocillos de alta unión directamente con 50 µl de una solución de Fab a 20 µg/ml en PBS 1x durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se incubaron con tampón de bloqueo durante 1 hora a RT. Inmediatamente después del bloqueo, las placas se incubaron en 50 µl de una solución de RC1 o RC1-glicanoKO-GAIA ("GAIA" descrito como la SEQ ID NO: 16) a 2 µg/ml en tampón de bloqueo durante 1 hora a RT. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se incubaron durante 1 h a RT con 50 µl de una versión quimérica (Fab humanos y Fc de ratón) del bNAb 3BNC60 con sitio de unión a CD4 en tampón de bloqueo en diluciones en serie de 3 veces que inicia a 5 µg/ml. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se incubaron durante 1 h a RT con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch #115-035-071). Las placas se lavaron y revelaron como anteriormente.

Citometría de flujo y clasificación de células B individuales

Se obtuvieron suspensiones de células individuales de los ganglios linfáticos drenantes y los bazo de ratones inmunizados, y las células B maduras se aislaron por selección negativa mediante el uso de perlas magnéticas anti-CD43 (MACS) según las instrucciones del fabricante.

Las PBMC congeladas o células de biopsias de ganglios linfáticos obtenidas de los macacos no expuestos y los

inmunizados se descongelaron y se lavaron en medio RPMI 1640 (1x) (Gibco #11875-093). Se incubaron células de ratón o macaco con 100 µl de una solución de tampón de FACS (PBS 1x con suero bovino fetal al 2 % y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM) con bloqueador de Fc de ratón (BD Biosciences #553142) o humano (BD Biosciences #564219) respectivamente a una dilución 1:500 durante 30 min en hielo.

5 RC1 y RC1-glicanoKO (RC1⁺/RC1 glicanoKO⁻) se prepararon mediante la incubación de 5 µg de RC1 con etiqueta Avitag y biotinilado (RC1-AviBio) o RC1-glicanoKO con etiqueta Avitag y biotinilado (RC1-glicanoKO AviBio) con estreptavidina con fluoróforo a una dilución 1:200 en PBS 1x durante 30 min en hielo.

10 Se aislaron células B de ratón RC1⁺/RC1-glicanoKO⁻ mediante el uso de RC1-AviBio conjugado con estreptavidina BV711 (BD Biosciences, #563262) y RC1-glicanoKO AviBio conjugado con estreptavidina-PE (BD Biosciences, #554061) como cebos. Se aislaron células B de macaco RC1⁺/RC1-glicano KO⁻ mediante el uso de tres cebos: RC1-AviBio conjugado con estreptavidina-PE y estreptavidina AF647 y RC1-glicanoKO AviBio conjugado con estreptavidina BV605 (BD Biosciences, #563260). Se mezclaron tetrámeros con los cócteles de anticuerpos humanos o de ratón indicados a continuación hasta una concentración final de 5 µg/ml para cada uno de ellos.

15 Las células de ratón se tiñeron con los siguientes anticuerpos con fluoróforo contra marcadores de superficie celular de ratón: anti CD4 APC-eFluor780 (Invitrogen, #47-0042-82), anti CD8 APC- eFluor780 (Invitrogen, #47-0081-82), anti F4/80 APC-eFluor780 (Invitrogen, #47-4801-82), anti NK1.1 APC-eFluor780 (Invitrogen, #47-5941-82), anti CD11b APC-eFluor780 (eBioscience #47-0112-82), anti CD11c APC-eFluor780 (eBioscience #47-0114-82), anti Gr-1 APC-eFluor780 (Invitrogen, #47-5931-82), anti B220 APC (Biolegend, #103212), anti GL7 FITC (BD Biosciences #553666) y anti CD95 BV421 (BD Biosciences #562633) a una dilución de 1:200 y el marcador de células vivas/muertas Zombie NIR (Biolegend, #77184) a una dilución 1:400 en tampón de FACS. Las células de macaco se tiñeron con los siguientes anticuerpos anti-humanos: anti-CD16 APC- eFluor780 (Invitrogen, #47-0168-41), anti-CD8a APC-eFluor780 (Invitrogen, #47-0086-42), anti-CD3 APC-eFluor780 (Invitrogen, #47-0037-41), anti-CD14 APC-eFluor780 (eBiosciences, #47-0149-41), anti-CD20 PeCy7 (BD, #335793), anti CD38 FITC (Stem Cell technologies, #60131F1), anti-IgG BV421 (BD Biosciences, #562581), anti-IgM PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, #561285) a una dilución 1:200 y el marcador de células vivas/muertas Zombie NIR a una dilución 1:400 en tampón de FACS. Se incubaron células de ratón o macaco con el correspondiente cóctel de anticuerpos que contenía los cebos RC1 y RC1-glicano KO durante 30 minutos en hielo, se lavaron con tampón de FACS y se resuspendieron en 1 ml de tampón de FACS. Antes de la clasificación o análisis, las suspensiones celulares se filtraron a través de un filtro de células de 40 µm.

20 Se aislaron células individuales Zombie NIR⁻/CD4⁻/CD8⁻/F4/80⁻/NK1.1⁻/CD11b⁻/CD11c⁻/B220⁺/GL7⁺/CD95⁺RC1⁺/ RC1-glicanoKO⁻ de los homogeneizados de células de ratón y se aislaron células individuales Zombie NIR⁻ /CD16⁻/CD8a⁻ /CD3⁻/CD14⁻/CD20⁺/CD38⁺/IgG⁺/doble RC1⁺/RC1-glicanoKO⁻ de los homogeneizados de células de macaco mediante el uso de un FACS Aria III (Becton Dickinson).

25 Las células individuales se clasificaron en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos que contenía 5 µl de tampón de lisis (tampón TCL (Qiagen #1031576) con 1 % de 2-β-mercaptoetanol). Las placas se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C.

Secuenciación y clonación de anticuerpos

30 Se descongelaron en hielo placas de 96 pocillos que contenían lisados de células individuales. El ARN de células individuales se purificó en un área limpia designada mediante el uso de perlas magnéticas (RNAClean XP, #A63987 Beckman Coulter) según las instrucciones del fabricante. En la etapa final del protocolo de purificación, se eluyó el ARN de las perlas magnéticas con 11 µl de una solución que contenía (14,5 ng/µl de cebadores aleatorios (Invitrogen, #48190-011), 0,5 % de tergitol (Tipo NP-40, 70 % en H₂O, Sigma-Aldrich, #NP40S-100ML), 0,6 U/µl de inhibidor de RNasa (Promega #N2615) en agua libre de nucleasas (Qiagen) y se incubó a 65 °C durante 3 min. Subsecuentemente se sintetizó ADNc mediante transcripción inversa (transcriptasa inversa SuperScript® III, Invitrogen, #18080-044, 10 000 U) como se describió previamente (von Boehmer, L. y otros *Nat Protoc* 11, 1908-1923 (2016)). El ADNc se almacenó a -80 °C o se usó para la amplificación de genes de anticuerpos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. Para amplificar los genes de anticuerpos de células B individuales, se añadieron 10 µl de agua libre de nucleasas a la solución que contenía ADNc.

35 Los genes de anticuerpos de ratón y macaco se amplificaron mediante PCR anidada como se describió previamente (von Boehmer, L. y otros *Nat Protoc* 11, 1908-1923 (2016)). PCR Protocols: (apareamiento (°C)/elongación (s)/número de ciclos): 1^{ra} PCR (IgG *IgH* e *Igλ*): 46/55/50; 2^{da} PCR (IgG *IgH* e *Igλ*): 50/55/50. Los ADNc de cadena pesada y cadena ligera amplificados se clonaron individualmente en vectores de expresión que contenían las regiones constantes completas del anticuerpo IgG humano o de ratón o la región constante 1 de la cadena pesada humana (vector de fragmento de unión a antígeno (Fab)) mediante el uso de la metodología de clonación independiente de secuencia y unión (SLIC) (Li, M. Z. & Elledge, S. J. *Nat Methods* 4, 251-256 (2007)).

Producción y purificación de anticuerpos

40 Se purificaron Ig a partir de 200 µl de suero de ratón o macaco mediante el uso de columnas Ab Spin Trap Protein G

Sepharose (GE Healthcare, #28-4083-47) según las instrucciones del fabricante. Las Ig se eluyeron en 4 fracciones de 200 μ l. Las fracciones que contenían Ig se sometieron a intercambio de tampón con PBS mediante diálisis durante la noche a 4 °C (casetes de diálisis con MWCO de 20 000 Thermo Scientific, #66005).

5 Para estudios estructurales, las IgG de ratón y los Fab etiquetados con His₆ de macaco ("His₆" descritos como la SEQ ID NO: 19) se expresaron mediante transfección transitoria en células HEK293-6E o Expi293 y se purificaron a partir de sobrenadantes celulares mediante el uso de cromatografía con proteína A o G (GE Healthcare) (para las IgG) o Ni-NTA (GE Healthcare) o Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) (para los Fab) y SEC como se describió (Scharf, L. y otros *Cell* 162, 1379-1390 (2015)). El Fab de ratón se obtuvo mediante la digestión de IgG a 1-5 mg ml⁻¹ con ficina (Sigma) mediante el uso de un protocolo modificado de Thermo Scientific. Fab se purificó mediante cromatografía de proteína G (GE Healthcare) y SEC como se describió, seguido de cromatografía de intercambio iónico Mono Q 5/50 (GE Healthcare) (Diskin, R. y otros, *Nat Struct Mol Biol* 17, 608-613). El iGL común de los bNAb PGT121 y 10-1074 se expresó como Fab con etiqueta de His₆ ("His₆" descrito como la SEQ ID NO: 19) como se describió anteriormente.

15 Ensayo de neutralización in vitro

Los ensayos de TZM-bl se realizaron como se describió (Montefiori, D. C. *Curr Protoc Immunol* Capítulo 12, Unidad 12_11 (2005)). En resumen, la actividad de neutralización se calculó en función de la reducción de la expresión de luciferasa inducida por Tat en la línea celular informadora TZM-bl después de una única ronda de infección por virus.

20 SPR

Los experimentos de SPR se realizaron mediante el uso de un Biacore T200 (Biacore). Para medir la afinidad por el Fab de iGL de PGT121/10-1074, se inmovilizó la proteína A en un chip CM5 (Biacore) mediante química de amina primaria (manual de Biacore) y se inyectaron 200 nM de IgG anti-Env 8ANC195_{G52K5} en celdas de flujo experimentales como se describió (Scharf, L. y otros *Cell* 162, 1379-1390 (2015)). Se creó una celda de flujo de referencia mediante la inyección de IgG mGO53 a 200 nM, que no se une a las Env del VIH. Se inyectó Fc humano a 1 μ M para bloquear los sitios de proteína A restantes. Después de capturar la proteína SOSIP a 10 μ M (RC1, _11MUTB o 10MUT), se realiza una serie de concentraciones de Fab de iGL de PGT121/10-1074 (diluciones de 4 veces desde una concentración máxima de 160 μ M para 10MUT y diluciones de 2 veces desde una concentración máxima de 150 μ M para _11MUTB y RC1) y se permitió que las reacciones de unión alcanzaran el equilibrio. Las celdas de flujo se regeneraron con glicina 10 mM, pH 2,0 y guanidina HCl 1 M a un régimen de flujo de 90 μ l/min como se describió (Scharf, L. y otros *Cell* 162, 1379-1390 (2015)). Las K_d se obtuvieron mediante análisis de regresión no lineal de diagramas de R_{eq} (la respuesta de unión en equilibrio) frente al registro de la concentración de proteína inyectada, y los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 como se describió (Vaughn, y otros *Biochemistry* 36, 9374-9380 (1997)).

Para medir la unión relativa de anticuerpos aislados de ratones y monos, se inmovilizaron trómeros de Env SOSIP en un chip CM5 mediante química de amina primaria y se inyectaron Fab seleccionados a 200 nM. Las celdas de flujo se regeneraron con glicina 10 mM, pH 2,0.

Preparación de muestras de crio-ME

45 Se preparó RC1 en complejo con 10-1074 mediante la incubación de RC1 purificado con Fab de 10-1074 y un Fab de sitio de unión a CD4 (CD4bs) en una relación molar 1:3:3 (protómero gp140: Fab de 10-1074: Fab de CD4bs) durante la noche a temperatura ambiente. El complejo RC1-Fab se aisló mediante SEC en TBS (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM) mediante el uso de una columna Superdex-200 Increase 10/300 (GE Healthcare). Se prepararon complejos de RC1 con Fab de ratón y macaco mediante la incubación de RC1 purificado con un Fab de ratón o macaco y con Fab de 8ANC195 en una relación molar de 1:1,3:1,3 (protómero gp140: Fab de ratón o macaco:Fab de 8ANC195) durante la noche a temperatura ambiente y se usaron sin purificación por SEC. Los complejos RC1-Fab se diluyeron a 0,75-1,4 mg/ml en TBS, se añadieron a rejillas de cobre Quantifoil R1,2/1,3 de malla 300 con descarga luminosa y se vitrificaron en etano líquido mediante el uso de un Vitrobot Mark IV (FEI).
Recopilación de datos de crio-ME

55 Se obtuvieron imágenes de los complejos RC1-Fab en un microscopio crioeléctrico Talos Arctica que opera a 200 kV y está equipado con un detector de electrones directo Falcon 3EC mediante el uso del software de adquisición de imágenes automatizado EPU (Tan, y otros *Microscopy (Oxf)* 65, 43-56 (2016)). Los datos de RC1-10-1074 se recopilaron en dos días separados y se combinaron durante el procesamiento. Cada micrografía se recopiló con un aumento de 73 000, lo que da como resultado un tamaño de píxel de 1.436 Å.

60 Procesamiento de datos de crio-ME

Las micrografías de película se corrigieron por movimiento en RELION-3 y se ponderaron con dosis mediante el uso de MotionCor2, los CTF se estimaron mediante el uso de Gctf y las partículas se seleccionaron de las micrografías mediante el uso de la selección automática de burbujas gaussianas (Zivanov, J. y otros *Elife* 7 (2018); Zheng, S. Q. y otros, *Nat Methods* 14, 331-332 (2017); Zhang, K. Gctf. *J Struct Biol* 193, 1-12 (2016)). Las partículas extraídas se

importaron a cryoSPARC v2 y se clasificaron en promedios de clase 2D (Punjani, A., y otros *Nat Methods* 14, 290-296 (2017)). Las partículas seleccionadas se clasificaron en dos modelos ab initio, y el modelo seleccionado se usó como referencia en el refinamiento homogéneo de esas partículas seleccionadas. Las resoluciones se estimaron mediante el uso de la correlación de capa de Fourier Gold Standard de semimapas refinados independientemente (donde FSC=0,143), y los mapas se afinaron automáticamente en cryoSPARC (Punjani, A., y otros *Nat Methods* 14, 290-296 (2017); Scheres, S. H. & Chen, S. *Nat Methods* 9, 853-854 (2012);). Para interpretar los glicanos con enlace a N, se generaron una serie de mapas con factores B generales que varían de -150 a -400 Å² para mejorar las características locales y la conectividad de mapas en los PNGS (Terwilliger, T. C., y otros *Acta Crystallogr D Struct Biol* 74, 545- 559 (2018)).

Construcción del modelo

Las coordenadas de los componentes individuales de cada complejo se acoplaron a los mapas mediante el uso de quimera UCSF. Para el complejo RC1-10-1074, BG505 (PDB 5T3Z), Fab de 10-1074 (PDB 5T3Z) y Fab de 8ANC131 (PDB 4RWY) se acoplaron a la densidad (Goddard, T. D., y otros *J Struct Biol* 157, 281-287 (2007)). Para los complejos Fab de ratón o macaco con RC1, las coordenadas de Env de BG505 (PDB 5CEZ), Fab de iGL de PGT121/10-1074 (PDB 4FQQ) y Fab de 8ANC195 (PDB 5CJX) se acoplaron en mapas de densidad. Después de reemplazar secuencias para los Fab en los complejos y de RC1, los modelos se construyeron siguiendo rondas iterativas de refinamiento en Coot y Phenix (Adams, P. D. y otros *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221 (2010); Emsley, P., y otros *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501 (2010)). Las coordenadas de los glicanos se agregaron como Man₉ y luego se recortaron para ajustarse a los mapas en $\sigma=5$. La validación del modelo se realizó mediante el uso de MolProbity y Privateer (Chen, V. B. y otros *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 12-21 (2010); Agirre, J. y otros *Nat Struct Mol Biol* 22, 833-834 (2015)).

El sitio de unión a CD4 de Fab en el complejo RC1-10-1074 y el Fab de 8ANC195 en los complejos de RC1 con Fab de ratón y macaco no se mostraron en las figuras de estructura, y sus coordenadas no se incluyeron en las estructuras del complejo RC1-Fab depositadas en las EMDB y PDB.

Software de análisis

Se usaron Geneious X y MacVector 15.5.3 para el análisis de secuencia y los gráficos se crearon mediante el uso del lenguaje R. Los datos de citometría de flujo se procesaron mediante el uso de FlowJo 10.5.0. Se usó GraphPad Prism 7 para el análisis de datos.

Cuantificación y análisis estadístico

La información estadística, que incluye los valores de n, media y significación estadística, se indica en el texto o en las leyendas de las figuras. Se usó GraphPad Prism 7 para el análisis estadístico mediante prueba T para datos independientes. Los datos se consideraron estadísticamente significativos en *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 y ****p ≤ 0,0001.

Ejemplo 2

RC1 facilita la unión de anticuerpos al epítipo de glicano V3

RC1 se diseñó mediante el uso de _11MUTB, un trímero de Env soluble similar al nativo modificado (SOSIP.664) derivado de la Env de BG505 del clado AE, como plantilla. En comparación con BG505, _11MUTB incluye múltiples sustituciones en V1 y carece de sitios potenciales de glicosilación por enlace a N (PNGS) en las posiciones N133 y N137 (Figura 1a) (Steichen, J. M. y otros *Immunity* 45, 483-496 (2016); Sanders, R. W. y otros, *PLoS Pathog* 9, e1003618 (2013)). Se planteó la hipótesis de que la eliminación adicional del PNGS en la posición 156 (N156Q) facilitaría el reconocimiento del parche de glicano V3 al aumentar la accesibilidad de las partes de V1 que interactúan con los bNAb contra el parche de glicano V3. De acuerdo con esta idea, la ausencia del PNGS N156 mejora la neutralización con PGT121 y 10-1074 (Figura 6a). Además, luego se planteó la hipótesis de que la eliminación del glicano en N156, que incluye ácidos siálicos terminales cargados negativamente, produciría una superficie Env electrostáticamente más neutra que podría facilitar la unión del anticuerpo en gran medida neutro precursor de los bNAb contra el glicano V3 PGT121 y 10-1074 (iGL de PGT121/10-1074).

RC1 se caracterizó inicialmente por evaluación de sus interacciones con bNAb mediante ELISA. Como se esperaba, un bNAb específico de V1-V2 que interactúa con el glicano en N156 mostró una unión reducida a RC1 en comparación con BG505 (Figuras 6a y 6b). Por el contrario, los bNAb que se dirigen al epítipo de glicano V3, el sitio de unión a CD4 o la interfaz gp120-gp41 se unieron de manera similar a RC1 y BG505 (Figura 6b). Por tanto, RC1 retuvo las propiedades antigénicas generales de BG505.

Para caracterizar mejor RC1, se resolvió una estructura crio-ME de una sola partícula de 4,0 Å de RC1 en complejo con el fragmento de unión a antígeno (Fab) de 10-1074 y se comparó con una estructura del mismo bNAb unido a BG505 (Figura 1b; Figura 7; Tabla 3). La estructura de RC1 era similar a BG505, y ambos mostraban la conformación

cerrada de Env y contenían tres Fab de 10-1074 que se unían a los tres epítomos del parche de glicano V3 (Figura 1b). En comparación con BG505, el lazo V1 en RC1 incluyó residuos más ordenados y se desplazó hacia el CDRH3 de 10-1074, lo que permitió mayores interacciones entre el RC1 y 10-1074 (Figura 1b).

5 A pesar de los cambios estructurales en V1 resultantes de la eliminación del glicano en N156 (Figura 1b), el precursor iGL común de PGT121 y 10-1074 se unió a RC1 y $_11\text{MUTB}$ con afinidades similares ($K_D \sim 50 \mu\text{M}$) (Figura 1c). De acuerdo con estas observaciones, RC1 y $_11\text{MUTB}$ provocaron respuestas serológicas comparables específicas del epítomo de glicano V3 en ratones con inserción génica (KI) portadores de genes que codifican el iGL de PGT121/10-1074 (Figuras 2a y 2b). En conclusión, RC1 exhibió cambios estructurales con respecto a BG505, pero estos no afectaron su afinidad por el anticuerpo precursor iGL de PGT121/10-1074.

Ejemplo 3

RC1 provoca anticuerpos contra el parche de glicano V3 en ratones de tipo salvaje

15 Para determinar si RC1 puede activar las células B portadoras de anticuerpos específicos contra el parche de glicano V3 en ratones de tipo salvaje, se inmunizaron ratones C57B1/6 con RC1 o $_11\text{MUTB}$. $_11\text{MUTB}$ no logró producir una respuesta serológica medible (Figura 2c). Por el contrario, los ratones inmunizados con RC1 mostraron respuestas reproducibles contra el parche de glicano V3 según lo determinado por ELISA que compara la unión a RC1 y a un RC1 mutante que carece de dos PNGS de V3 adicionales en las posiciones 301 y 332 (RC1-glicanoKO) (Figuras 2c, 2d, 2e y 2f; Tabla 2). Además, el suero de los ratones inmunizados con RC1 tuvo una reacción cruzada con $_11\text{MUTB}$ pero no con la Env 10MUT más nativa ni con BG505 (Figura 8). La inmunogenicidad mejorada del epítomo del parche de glicano V3 de RC1 es el resultado de la eliminación específica del glicano en N156 de $_11\text{MUTB}$ porque la eliminación del glicano en N301 de $_11\text{MUTB}$ ($11\text{MUTB}\Delta 301$) (ver la Tabla 2) no logró inducir respuestas serológicas detectables en ratones (Figura 2g). Se concluyó que, a diferencia de $_11\text{MUTB}$ y $11\text{MUTB}\Delta 301$, RC1 provoca respuestas serológicas específicas de glicano V3 en ratones de tipo salvaje.

30 Para reducir las respuestas de anticuerpos a epítomos inespecíficos y enfocar aún más la respuesta en el parche de glicano V3, se produjo una variante de RC1, RC1-4fill, mediante la adición de PNGS para cubrir posibles sitios inespecíficos con glicanos en las posiciones de gp120 230, 241, 289 y 344 (Figura 9). RC1-4fill provocó respuestas serológicas que fueron más específicas del parche de glicano V3 en ratones de tipo salvaje que las provocadas por RC1, según lo determinado por ELISA contra RC1 y RC1-glicanoKO (Figura 2h). Se concluyó que RC1-4fill enfoca las respuestas de anticuerpos al epítomo del parche de glicano V3.

Ejemplo 4

Expansión clonal de células B específicas contra el parche de glicano V3 en ratones de tipo salvaje

40 Para caracterizar mejor las respuestas humorales provocadas por RC1 y RC1-4fill en ratones de tipo salvaje, se secuenciaron los genes de anticuerpos de células B del GC individuales que se unían a RC1 pero no a RC1-glicanoKO (Figura 10). Todos los ratones inmunizados con RC1 y RC1-4fill analizados mostraron una expansión de clones de células B del GC (Figura 2i). Los clones expandidos expresaron predominantemente los segmentos de genes V de cadena pesada VH5-6, VH9-3 y VH2-9, y los segmentos de cadena ligera VK3-4 y VK14-111 (Figura 2i; Tablas 4, 5 y 6). Las secuencias de CDRH3 en clones expandidos mostraron similitudes con los bNAb contra el parche de glicano V3 humano, tal como los motivos ricos en Tyr o RxY (Tablas 4 y 6) y los CDRH3 más largos que el promedio, pero ninguno tuvo inserciones o eliminaciones. Los genes VH de los clones expandidos tenían un promedio de 3,2 mutaciones de nucleótidos (Figura 2j; Tabla 4).

50 Para determinar el sitio objetivo de los anticuerpos producidos por los clones de células B expandidos, se clonaron y produjeron anticuerpos seleccionados, y se realizaron ELISA contra RC1 y proteínas mutantes RC1. Un grupo diverso de anticuerpos monoclonales (mAb) mostró unión específica del parche de glicano V3 en ELISA (Figura 2k). Una mayor caracterización de las propiedades de unión a Env de dos mAb aislados de ratones inmunizados con RC1 ($\text{Ab}275_{\text{MUR}}$) o RC1-4fill ($\text{Ab}276_{\text{MUR}}$) mostraron que estos anticuerpos se unen al epítomo del parche de glicano V3 de una manera dependiente de GDIR (SEQ ID NO: 15) y glicano en N301 (Figura 21; Tabla 2). Ambos anticuerpos se unieron a $_11\text{MUTB}$, pero no a BG505 ni a un péptido que cubre la corona del lazo V3 (Figura 21; Figura $_11\text{a}$). $\text{Ab}275_{\text{MUR}}$ se unió a RC1 con una $K_D \sim 30 \text{ nM}$ (Figura $_11\text{b}$). Es importante destacar que $\text{Ab}275_{\text{MUR}}$ retuvo la unión a $_11\text{MUTB}$ ($K_D \sim 230 \text{ nM}$), lo que demuestra que podría alojar el glicano en N156 (Figura $_11\text{c}$). Las mutaciones adquiridas fueron esenciales para la unión porque la reversión a la secuencia de iGL condujo a la pérdida de unión a RC1 (Figura $_11\text{d}$). Como era de esperar, ni $\text{Ab}275_{\text{MUR}}$ ni $\text{Ab}276_{\text{MUR}}$ mostraron actividad neutralizante detectable contra un pequeño panel de aislados de VIH-1 de nivel 1B y nivel 2 en ensayos de TZMbl (no se muestran los datos). Por lo tanto, se concluyó que RC1 y RC1-4fill expanden clones de células B de ratón que expresan anticuerpos dirigidos al parche de glicano V3.

Ejemplo 5

65 VLP-RC1-4fill provoca anticuerpos contra el parche de glicano V3 en conejos y macacos Rhesus

Para mejorar los efectos de avidez potenciales y limitar la exposición de epítomos inespecíficos adicionales en la base del trímero de Env, se multimerizó RC1-4fill en partículas similares a virus (VLP) mediante el uso del sistema Spytag-SpyCatcher (Figuras 3a y 3b). Se cree que los conejos y los macacos Rhesus son mejores modelos que los ratones para los estudios de vacunas contra el VIH-1 porque sus anticuerpos tienen CDRH3 más largos que los del ratón (un promedio de 11 residuos en ratones, 13 en conejos y 15 tanto en macacos Rhesus como en seres humanos).

La inmunización de 4 conejos y 8 macacos Rhesus con VLP de RC1-4fill provocó respuestas serológicas que fueron en parte específicas para el parche de glicano V3 en todos los animales, según lo determinado por ELISA contra RC1 y el RC1-glicanoKO (Figuras 3c y 3d). El suero de los macacos sensibilizados con VLP de RC1-4fill mostró una unión secuencialmente reducida a los inmunógenos más similares a los nativos 11MUTB y 10MUT (Figura 12). Por lo tanto, las VLP de RC1-4fill provocaron respuestas serológicas fuertes que se asignaron al parche de glicano V3 en conejos y macacos Rhesus.

Para caracterizar mejor las respuestas provocadas por las VLP de RC1-4fill en macacos, las células B del GC de los ganglios linfáticos drenantes que se unían a RC1 pero no a RC1-glicanoKO se purificaron mediante citometría de flujo (RC1⁺/RC1-glicanoKO⁻). Mientras que las células RC1⁺ estaban ausentes de los GC de macacos no expuestos, las células B del GC RC1⁺/RC1-glicanoKO⁻ se encontraron con una frecuencia promedio de 0,4 % de todas las células B del GC en los ganglios linfáticos de los 4 macacos analizados (Figuras 3e y 3f).

La clonación de anticuerpos de los 4 macacos inmunizados reveló que todos mostraban clones de células B expandidas que usaban una variedad de genes de VH con un promedio de mutaciones somáticas de 5,6 nucleótidos (Figuras 3g y 3h; Tabla 7). Los bNAb contra el parche de glicano V3 humano más caracterizados contienen una cadena ligera lambda. El análisis del uso de genes lambda reveló que las células que se unen a RC1 de macaco usaban con preferencia los genes de VL132, que es 90,6 % idéntico a VL2-8 en PGT125-128 y PGT130-131, y VL124, que es 93,8 % idéntico a VL3-21 en PGT121-123/10-1074 (Figura 3i; Tabla 8). Además, el 86 % de las cadenas ligeras lambda tenían CDRL3 que incluían un motivo DSS presente en los iGL de PGT121-123, 10-1074 y PGT124 (Figura 3j; Tabla 9). Este motivo muta a DSR en los bNAb maduros, y esta sustitución es crítica para la actividad de neutralización de PGT121. Se concluyó que la inmunización de macacos con VLP de RC1-4fill expande los clones de células B cuyas secuencias de anticuerpos se asemejan a los precursores de bNAb contra el parche de glicano V3 humano.

Se expresaron 38 anticuerpos de GC de macaco con CDRL3 que se asemejaban a los CDRL3 de iGL de bNAb contra el parche de glicano V3 (Tabla 10). Los CDRL3 de 33 de estos anticuerpos contenían un motivo DSS y una Q en la posición 89 (motivo QxxDSS (SEQ ID NO: 20)), que también se encuentra en los CDRL3 de los iGL de PGT121-3, 10-1074, PGT124 y BG18 (Tabla 11). Los otros cinco anticuerpos contenían un motivo SYAG (SEQ ID NO: 21), que está presente en los CDRL3 de los iGL de PGT125-7, PGT128, PGT130 y PGT131 (Tabla 11). Treinta de los 33 anticuerpos que contienen el motivo QxxDSS ("QxxDSS" descrito como la SEQ ID NO: 20) y 2 de los 5 anticuerpos que contienen el motivo SYAG ("SYAG" descrito como la SEQ ID NO: 21) se unieron al epítipo del parche de glicano V3, según lo determinado por ELISA mediante el uso de RC1 y RC1-glicanoKO-GAIA ("GAIA" descrito como SEQ ID NO: 16) (Figura 4a; Tabla 10). La longitud de CDRH3 de estos 38 anticuerpos contra el parche de glicano V3 varió de 11 a 21 residuos (promedio=15,5 residuos) (Figura 4b). Los CDRH3 más largos incluían un alto contenido de residuos de Tyr y/o Phe, similar al de los CDRH3 largos de los bNAb contra el parche de glicano V3 humano (Tabla 10). Los genes de VH y VL de estos anticuerpos tenían un promedio de 4,9 y 3,3 mutaciones de nucleótidos, respectivamente (Figura 4c).

Para caracterizar mejor el reconocimiento de RC1 por anticuerpos, se realizaron ELISA contra mutantes adicionales RC1-glicanoKO, RC1-GAIA ("GAIA" descrito como SEQ ID NO: 16), RC1-glicanoKO-GAIA ("GAIA" descrito como SEQ ID NO: 16), 11MUTBΔ301, RC1Δ301, RC1Δ332, 11MUTB y BG505 (Figuras 4d y 4e; Tabla 2). Los ELISA sugirieron cuatro patrones de unión diferentes a RC1 entre los anticuerpos que contenían un motivo QxxDSS (SEQ ID NO: 20) en el CDRL3 (Figura 4d) y un patrón adicional entre los anticuerpos que contenían un motivo SYAG (SEQ ID NO: 21) (Figura 4e). Mientras que todos los anticuerpos dependían de glicano según lo determinado por la ausencia de unión a RC1-glicanoKO, diferían en su unión a 11MUTB o 10MUT, en dependencia del motivo GDIR (SEQ ID NO: 15) y de los glicanos en N301, N332 y N156 (Figuras 4a, 4d y 4e). Ninguno de los anticuerpos analizados se unió a BG505 ni tuvo actividad neutralizante contra un pequeño panel de aislados de VIH-1 de nivel IB y nivel 2 en ensayos de TZMbl (Figuras 4d y 4e; no se muestran los datos). Se concluyó que la inmunización de macacos con VLP de RC1-4fill provoca anticuerpos específicos contra el parche de glicano V3 que se asemejan a los precursores de los bNAb humanos que se dirigen a este sitio.

Ejemplo 6

Estructuras crio-ME de anticuerpos de ratón y macaco en complejo con RC1

Para definir el mecanismo molecular de unión y comparar los modos de reconocimiento del parche de glicano V3, se determinaron las estructuras de los Fab de un ratón y dos macacos en complejo con RC1 mediante microscopía crio-electrónica de una sola partícula. Los tres anticuerpos se unieron al epítipo del parche de glicano V3 con huellas que se superponen con la huella de 10-1074, pero se unieron con diferentes ángulos de aproximación en comparación

con 10-1074 (Figuras 5a y 5b). Ab275_{MUR} (resolución 4,4 Å y Ab874_{NHP} (3,9 Å) (derivado del mismo clon que Ab876_{NHP}) se unieron de manera similar entre sí, consistente con su 69 % de identidad de secuencia, mientras que Ab897_{NHP} (4,4 Å) (relacionado por 48 % y 54 % de identidad de secuencia con Ab275_{MUR} y Ab874_{NHP}, respectivamente) adoptó un ángulo de aproximación distinto (Figura 5b).

Los tres Fab en los complejos de RC1 se pusieron en contacto con el motivo GDIR (SEQ ID NO: 15), pero con huellas diferentes comparados entre sí y con 10-1074. Mientras que 10-1074 se puso en contacto con el motivo GDIR conservado (SEQ ID NO: 15) mediante el uso de CDRH3, CDRL1 y CDRL3 (Figuras 1c y 5b), Ab874_{MUR} y Ab275_{NHP} principalmente hicieron contactos con GDIR (SEQ ID NO: 15) mediante el uso de sus CDRH2, y Ab897_{NHP} utilizó CDRL1 y CDRL3 (Figuras 5b y 5c). Además de los contactos con GDIR (SEQ ID NO: 15), Ab275_{MUR} y Ab874_{NHP} interactuaron con el glicano en N332 (Figuras 5a y 5b). Sin embargo, a diferencia de 10-1074, que interactúa ampliamente con el glicano en N332 por medio de su CDRL1, FRWL3, CDRH2 y CDRH3, Ab275_{MUR} hizo contactos mínimos mediante el uso de solo su CDRH2, y Ab874_{NHP} interactuó con el glicano en N332 con su CDRH2 y FRWH3. No se observaron interacciones con el glicano en N332 en la estructura Ab897_{NHP}-RC1. A pesar de la unión reducida de Ab275_{MUR}, Ab876_{NHP} (mismo clon que Ab874_{NHP}) y Ab897_{NHP} a RC1Δ301 (Figura 21), ninguno de los Fab en los complejos de RC1 mostró interacciones con el glicano en N301, lo que sugiere una heterogeneidad de glicano que ocultaría esta interacción y/o un cambio conformacional en un parche de glicano V3 que carece de este glicano que disminuiría la unión. Se concluyó que RC1 provoca anticuerpos dirigidos al parche de glicano V3 con distintos modos de unión en animales con repertorios de anticuerpos policlonales que incluyen los primates.

Los bNAb contra el VIH-1 se desarrollan en seres humanos infectados mediante rondas secuenciales de mutación somática en respuesta a un patógeno en rápida evolución. La vacunación con una serie de antígenos relacionados puede reproducir esta progresión de eventos en ratones genéticamente modificados portadores de cantidades superfisiológicas de linfocitos B que expresan los precursores iGL de los bNAb. Un objetivo importante del diseño de la vacuna contra el VIH-1 es diseñar inmunógenos que inicien esta respuesta en organismos con sistemas inmunitarios policlonales con el objetivo de reproducir estas respuestas en seres humanos.

El diseño de inmunógenos de la vacuna contra el VIH-1 se ha enfocado en aumentar la afinidad de los inmunógenos candidatos por precursores iGL de bNAb específicos con el objetivo de reclutar un grupo específico de precursores raros en el GC. Este enfoque típicamente no tiene en cuenta los aumentos en la afinidad aparente producidos por las interacciones entre el antígeno multimerizado y los receptores de antígeno polivalentes en la superficie de una célula B. Además, la entrada a los GC está limitada principalmente por la competencia. Por lo tanto, la importancia de la afinidad es relativa, como lo demuestra la observación de que las células B que tienen receptores de baja afinidad se encuentran con frecuencia en los GC en condiciones fisiológicas.

Los principios empleados para producir RC1 no tuvieron en cuenta la afinidad. En cambio, RC1 se diseñó para aumentar la cantidad de progenitores de bNAb que pueden competir por la entrada a los GC. Esto se realizó al aumentar la disponibilidad del sitio objetivo antigénico y al mismo tiempo facilitar la unión a precursores iGL electrostáticamente neutros. Además, la VLP de RC1-4fill incorpora la idea de que enmascarar la competencia por epítopos inespecíficos minimiza la competencia por la entrada a los GC.

RC1 se diferencia de otros candidatos vacunales contra el VIH-1 en que induce a que las células B que expresan anticuerpos contra un epítipo específico experimenten expansión clonal en los GC en animales con un repertorio de células B totalmente policlonal. En los macacos, estas células B expresan anticuerpos que muestran similitudes estructurales y de secuencia con los precursores iGL de bNAb dirigidos al parche de glicano V3. Por lo tanto, las VLP de RC1-4fill son un inmunógeno candidato adecuado para estrategias de vacunación secuencial que tienen como objetivo provocar bNAb contra glicano V3.

Ejemplo 7

Las VLP y NP de RC1-3fill se comportan de manera similar a las VLP y NP de RC1

Los cromatogramas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para los inmunógenos RC1, RC1-3fill y RC1-4fill (Figura 13a) muestran que una fracción más pequeña de los inmunógenos RC1 y RC1-3fill eluyen en el volumen muerto en comparación con RC1-4fill, lo que demuestra que RC1 y RC1-3fill son más estables y menos propensos a agregarse que RC1-4fill. Los rendimientos representativos de una expresión de IL en células HEK 293T 6E para cada inmunógeno (Figura 13b) sugieren que RC1-3fill se expresó a un nivel más alto que RC1-4fill y a un nivel similar a RC1.

La Figura 13c muestra cromatogramas de SEC representativos de la purificación de AP205-RC1-VLP (gris oscuro) y AP205-RC1-3fill-VLP (negro). La Figura 13d muestra micrografías electrónicas de las AP205-RC1-VLP (izquierda) y las AP205-RC1-3fill-VLP (derecha), que muestran que las AP205-RC1-3fill-VLP tienen un aspecto similar a las AP205-RC1-VLP y tienen un número similar de trímeros conjugados por partícula. Las micrografías también muestran que la estrategia de purificación fue suficiente y no había trímero libre en ninguna de las muestras. Cromatogramas de SEC representativos de la purificación de las mi3-RC1-NP (gris oscuro) y las mi3-RC1-3fill-NP (negro) (Figura 13e) que muestran que RC1 y RC1-3fill se pueden conjugar con NP mi3. Las micrografías electrónicas de las mi3-RC1-NP

(izquierda) y las mi3-RC1-3fill-NP (derecha) (Figura 13f) muestran que las mi3-RC1-3fill-NP tienen un aspecto similar a las mi3-RC1-NP y tienen un número similar de trímeros conjugados por partícula. Las micrografías también muestran que la estrategia de purificación fue suficiente y no había trímero libre en ninguna de las muestras. Los perfiles de SEC tanto para la purificación inicial de las AP205-RC1-VLP (Figura 13g) como para las mi3-RC1-NP (Figura 13h), y una reinyección de la muestra a los 28 días (AP205) y 11 días (mi3) demuestran que las partículas conjugadas eran estables en el tiempo y no se observaron RC1 sin conjugar ni productos de degradación después del almacenamiento durante 28 u 11 días.

Se analizó la unión del suero de seis ratones WT inmunizados con las mi3-RC1-NP (Figura 13i) o las mi3-RC1-3fill-NP (Figura 13j) a RC1 (negro) y RC1 glicano KO (gris). El suero de los seis ratones inmunizados con Mi3-RC1 o Mi3-RC1-3fill se unió a RC1 en un ELISA y tuvo una unión reducida al RC1 glicano KO, lo que sugiere una respuesta sérica específica contra el parche de glicano V3/N332. Se incluyeron los anticuerpos monoclonales 10-1074 y 3BNC117 como controles positivo y negativo. Los datos de ELISA se muestran como área bajo la curva (AUC) de ELISA.

Tabla 3. Estadísticas de recopilación y procesamiento de datos Crio-ME.

Env	RC1	RC1	RC1	RC1
Fab	10-1074; CD4bs	Ab275 _{MUR} ; 8ANC195	Ab874 _{NHP} ; 8ANC195	Ab897 _{NHP} ; 8ANC195
Concentración (mg/ml)	0,75	1,25	1,25	1,4
Tiempo de transferencia (s)	3,5	3,0	2,0	3,5
Microscopio	FEI Talos Arctica	FEI Talos Arctica	FEI Talos Arctica	FEI Talos Arctica
Tensión (kV)	200	200	200	200
Detector	Falcon 3EC	Falcon 3EC	Falcon 3EC	Falcon 3EC
Modo de registro	recuentos	recuentos	recuentos	recuentos
Aumento	73k	73k	73k	73k
Tamaño de píxel (Å)	1,436	1,436	1,436	1,436
Tasa de dosis (e-/px/s)	0,73, 0,77	1,28	1,3	1,3
fotogramas por micrografía	39	40	39	39
Dosis total (e-/Å ²)	39,1	40	40	40
Intervalo de desenfoco (µm)	1-3,4	0,8-2,5	0,8-2,5	0,8-2,5
número de micrografías	684	328	465	510
número de partículas	122,013	49,308	86,564	158,954
simetría	C3	C3	C3	C3
resolución (FSC 0,143) (Å)	4,05	4,39	3,90	4,43
Factor B (Å ²)	-281,9	-252,4	-230,0	-322,1

ES 2 993 834 T3

Tabla 4. Secuencias de anticuerpos generados a partir de ratones inmunizados con RC1 y RC1-4fill.

Ratón 5							
	VH	DH	JH	CDRH3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	Mut. de Nt
5	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	5
10	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	5
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	4
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	3
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	6
15	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	2
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELACFAY	23	11	3
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	6
20	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	4
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	2
	IGHV1-84*01		IGHJ3*01	ANGDALAWFAY	24	11	5
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	2
25	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	5
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	6
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	5
30	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	4
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ACGDELAWFAY	25	11	3
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	ASGDELAWFAY	22	11	2
	IGHV1-84*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	AGGDELAWFAY	26	11	7
35	IGHV1-72*01	IGHD2-4*01	IGHJ3*01	VRGEVYYDYDGFAY	27	14	8
	IGHV1-72*01	IGHD2-4*01	IGHJ3*01	ARGEVYYDYDGFAY	28	14	1
	IGHV1-9*01	IGHD2-4*01	IGHJ1*03	ARIRSDYDVGWYFDV	29	16	4
	IGHV1-9*01	IGHD2-4*01	IGHJ1*03	ARIRSDYDVGWYFDV	29	16	4
40	IGHV1-72*01	IGHD1-1*01	IGHJ2*01	ARYYYGHYFDY	30	11	5
	IGHV1-9*01	IGHD2-14*01	IGHJ2*01	VRSGIYYFDY	31	10	5
	IGHV1-72*01	IGHD1-1*01	IGHJ2*01	ARYLLLRPFDY	32	11	4
45	IGHV1-22*01	IGHD1-1*01	IGHJ4*01	ARAGTTGYVMDY	33	12	3
	IGHV1-74*01	IGHD6-1*01	IGHJ4*01	AIASYYYTLDY	34	11	5
	IGHV1-19*01	IGHD3-2*02	IGHJ3*01	ARRGAAQAPFAY	35	12	3
	IGHV1-82*01	IGHD4-1*01	IGHJ3*01	VRSELGPAFAY	36	11	7
50	IGHV1-22*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*01	ARRGYGYGAMDY	37	12	1
	IGHV1-61*01	IGHD2-5*01	IGHJ3*01	ARAYSNYVPWFAY	38	13	0
	IGHV1-69*01	IGHD2-10*02	IGHJ2*01	ARREYGFDFY	39	10	6
Ratón 6							
55	IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*01	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	3
	IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*01	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	6
	IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*01	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	0
	IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*01	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	2
60	IGHV5-6*01	IGHD4-1*01	IGHJ4*01	ARHGRLTGTGAMDY	40	14	2
	IGHV5-6*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*01	ARHGAGNALDY	41	11	2
	IGHV5-6*01		IGHJ4*01	ARHGAGNAMDY	42	11	3
65	IGHV5-6*01		IGHJ4*01	ARHGAGNAMDY	42	11	6
	IGHV5-6*01		IGHJ4*01	ARHGAGNAMDY	42	11	2

ES 2 993 834 T3

	IGHV9-3*01	IGHD2-1*01	IGHJ2*01	QVEVTMWTT	43	9	0
	IGHV9-3*01		IGHJ2*01	ASGRNYVDY	44	9	3
5	IGHV9-3*01		IGHJ2*01	ASGPNYFDY	45	9	3
	IGHV5-6*01	IGHD1-1*01	IGHJ4*01	ARHGHYYGSSYGMDY	46	15	2
	IGHV1-75*01	IGHD1-1*02	IGHJ1*01	ARDDGGYWFYFDV	47	12	1
	IGHV2-9*01	IGHD1-3*01	IGHJ4*01	ANIPKDRLCYGP	48	12	2
10	2*01	IGHD2-3*01	IGHJ3*01	ARHEEDGYWFAY	49	12	11

Tabla 5. Secuencias de anticuerpos generados a partir de ratones inmunizados con RC1 y RC1-4fill.

CADENAS LIGERAS							
RATÓN	VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	Mut. de Nt	
15	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	3
20	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	4
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPFT	52	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	10
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LRYYDDFPYT	53	9	5
25	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
30	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	8
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	0
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	IQYDEFPYT	54	9	4
35	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPFT	52	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	5
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	6
40	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDEFPYT	55	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDLPT	56	9	6
45	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPFT	52	9	1
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	1
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDLPT	56	9	5
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
50	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	8
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPHT	57	9	4
55	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	6
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LHYDDFPYT	51	9	3
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	0
60	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDESPYT	58	9	9
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
	6	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
	6	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
65	6	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPCT	59	9	1

ES 2 993 834 T3

	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	0
	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	5
5	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPHY	57	9	3
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDDFPHT	60	9	5
10	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
	4	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNVDPYT	62	9	2
15	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSHEDPYT	63	9	11
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	8
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
20	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	8
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNVDPYT	62	9	27
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
25	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	7
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	12
	6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QHSNEDPYT	64	9	2
30	6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
	6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
	6	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	3
	1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	0
35	1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
	1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
	1	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
40	3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	0
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
	4	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	0
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	1
45	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	2
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQGNEDPPWT	66	10	1
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	2
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	2
50	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	HQSNEDPPWT	67	10	2
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQINEDPPWT	68	10	3
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	7
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	10
55	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	0
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	11
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSYEDPPWT	69	10	1
60	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	10
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSYEDPPWT	69	10	11
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	13
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPPWT	65	10	7
65	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	1
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	3

ES 2 993 834 T3

	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQNNEDPWT	71	9	3
	6	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	6
5	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	3
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	0
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	8
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	1
10	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	15
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	0
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	4
	1	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	16
15	2	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	1
	2	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	2
	2	IGKV3-4*01	IGKJ1*01	QQSNEDPWT	70	9	5
20	6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	4
	6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	2
	6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFTFT	72	9	2
	6	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	8
25	1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	3
	1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	0
	1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	0
	1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	0
30	1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	4
	1	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPFT	52	9	3
35	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYDSYPYT	73	9	7
	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNNYPYT	74	9	2
	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	8
	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNTYPYT	76	9	10
	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	2
40	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	8
	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNIYPYT	77	9	5
	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	6
	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	4
45	6	IGKV6-15*01	IGKJ2*01	QQYNSYPYT	75	9	2
	1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	5
	1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	2
50	1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	2
	1	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	5
	2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	1
	2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	1
55	2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	5
	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEMYT	79	9	2
	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEMYT	79	9	0
	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEMYT	79	9	0
60	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEMYT	79	9	2
	1	IGKV 10-96* 01	IGKJ1*01	QQGNTLPWT	80	9	1
	1	IGKV10-96* 01	IGKJ1*01	QQGNTIPWT	81	9	4
65	2	IGKV 10-96* 01	IGKJ1*01	QQGNTLPRT	82	9	1
	2	IGKV 10-96* 01	IGKJ1*01	QQGNTLPRT	82	9	5

ES 2 993 834 T3

	6	IGKV1-110*01	IGKJ1*01	SQSTHVPT	83	8	3
	6	IGKV1-110*01	IGKJ1*01	SQSTHVPT	83	8	0
5	6	IGKV1-110*01	IGKJ1*01	SQSTHVPT	83	8	2
	2	IGKV14-100*01	IGKJ5*01	VQYVQFPLT	84	9	2
	2	IGKV14-100*01	IGKJ5*01	VQYAQFPLT	85	9	2
	2	IGKV14-100*01	IGKJ5*01	VQYAQFPLT	85	9	1
10	3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	2
	3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	1
	1	IGKV1-117*01	IGKJ1*01	FQGSHPWT	86	9	2
	1	IGKV1-117*01	IGKJ1*01	FQGSHPWT	86	9	1
15	3	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	3
	3	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	2
	1	IGKV14-100*01	IGKJ4*01	VQYAQFPFT	87	9	4
20	1	IGKV14-126*01	IGKJ2*01	LQHGESPYT	88	9	0
	6	IGKV4-50*01	IGKJ2*01	QQFTSSPYT	89	9	2
	2	IGKV 10-96* 01	IGKJ2*01	QQGNTLPYT	90	9	3
	1	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFRTT	91	9	5
25	4	IGKV6-15*01	IGKJ5*01	QQYNSYPFT	92	9	1
	2	IGKV4-62*01	IGKJ5*01	QQCSGYPLT	93	9	3
	6	IGKV10-94* 01	IGKJ1*01	QQYSKLPWT	94	9	1
	2	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPYT	50	9	4
30	2	IGKV3-4*01	IGKJ4*01	QQSNEDPFT	78	9	3
	3	IGKV3-4*01	IGKJ2*01	QQSNEDPYT	61	9	3
	2	IGKV14-111*01	IGKJ2*01	LQYDEFPPFT	95	10	2
35	2	IGKV14-111*01	IGKJ4*01	LQYDEFPPFT	52	9	5
40							
45							
50							
55							
60							
65							

Tabla 6. Secuencias de anticuerpos generados a partir de ratones inmunizados con RC1 y RC1-4fill.

ANTICUERPO	RATÓN	INM.	VH	CDRH3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA).	VK	CDRL3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA).	RC1 UNIÓN A
271	1	RC1	IGHV5-6*01	ARHSRTGTGAMDY	96	13	IGKV3-4*01	QQSNEDPPWT	65	10	SI
340	2	RC1	IGHV1-	ARPYYYGSSPYFDY	97	14	IGKV4-57*01	QQRSSYPPT	109	9	NO
341	2	RC1	IGHV5-17*01	ARSIVPDY	98	8	IGKV14-100*01	VQYVQFPLT	84	9	SI*
343	2	RC1	IGHV5-6*01	ASLYGNAFDY	99	10	IGKV3-4*01	QQSNEDPFT	78	9	SI
344	2	RC1	IGHV9-3*01	ASGGNYFDY	100	9	IGKV14-111*01	LQYDEFPPFT	95	10	SI
346	2	RC1	IGHV5-6*01	ARHVGDHAMDY	101	11	IGKV3-4*01	QQSNEDPFT	78	9	SI
347	2	RC1	IGHV1-8P01	ARPYYYGSSPNFDY	102	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPWT	70	9	NO
351	3	RC1	IGHV9-3*01	GTGKNYFDH	103	9	IGKV14-111*01	LQYDEFFPYT	50	9	SI
352	3	RC1	IGHV5-6*01	ATNYGAWFPY	104	10	IGKV3-4*01	QQSNEDPYT	61	9	SI
274	4	RC1	IGHV5-6*01	ARHGITTGVAMDY	105	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPWT	70	9	SI
275	4	RC1	IGHV5-6*01	ARHGITTGVAMDY	105	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPYT	61	9	SI
276	6	RC1-4	IGHV5-6*01	ARHGRLTGTGAMD	40	14	IGKV3-4*01	QQSNEDPPWT	65	10	SI
278	6	RC1-4	IGHV5-6*01	ARHGRLTGTGAMD	40	14	IGKV3-4*01	HQSNEDPPWT	67	10	SI
280	6	RC1-4	IGHV5-6*01	ARHGYYGSSYGM	46	15	IGKV3-4*01	QQSNEDPPWT	65	10	SI
294	6	RC1-4	IGHV2-9*01	ANIPKDRLCYG	106	11	IGKV3-4*01	QQSNEDPWT	70	9	SI
348	NS	RC1	IGHV1-62-	ARHEGNYLYAMDY	107	13	IGKV4-62*01	QQCSGYPLT	93	9	SI
349	NS	RC1	IGHV1-7*01	ARPPFITWANYFDY	108	15	IGKV10-94*01	QQYSKLPWT	94	9	SI

ES 2 993 834 T3

Tabla 7. Secuencias de anticuerpos generados a partir de macacos inmunizados con VLP de RC1-4fill.

NHP 1							
	VH	DH	JH	CDRH3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	Mut. de nt
5	IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVNYGPLDY	110	11	3
10	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 2*01	IGHJ4*0 1	ARVVKNGPLDY	111	11	6
	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	3
15	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARLVRYGPLDY	113	11	7
	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARIVKYGPLDF	114	11	6
20	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	4
	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	2
25	IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDY	115	11	7
	IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDY	115	11	5
30	IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDH	116	11	7
	IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 2*01	IGHJ4*0 1	ARGSRIAPFDY	115	11	9
35	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	SRYQARGPIDS	117	11	3
	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDQARGPIDY	118	11	4
40	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARNQARGPIDY	119	11	27
	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDQARGPIDY	118	11	9
45	IGHV4_2C*F 124	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDNRIGPFDY	120	11	6
	IGHV4_2C*F 124	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDNRIGPFDY	120	11	6
50	IGHV4_2C*F 124	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ARDNRIGPFDY	120	11	4
	IGHV4_2C*F 124	IGHD2- 1*01	IGHJ4*0 1	ARDKRIGPFDY	121	11	6
55	IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	AKKRRQLENDY	122	11	4
	IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	VKKRRQLENDY	123	11	4
60	IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	AKKRRQLENDY	122	11	6
	IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	VKKRRQLENDY	123	11	4
65	IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASRIAGGPFDY	124	11	4

ES 2 993 834 T3

	IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASRIAGPPDF	125	11	8
5	IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASLIAAGPDFY	126	11	8
	IGHV4_11*S4 664	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	ASRIRGGPDFY	127	11	0
	IGHV4_3M*F 133	IGHD4- 2*01	IGHJ4*0 1	ARDIVVGPIDY	128	11	7
10	IGHV4_3M*F 133	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	ARDIVIGPIDY	129	11	11
	IGHV4_3M*F 133	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	ARDIVIGPIDY	129	11	6
15	IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ATVGR LAPFDY	130	11	5
	IGHV4_11*S4 129	IGHD2- 2*01	IGHJ4*0 1	ARVGRVVPFDY	131	11	5
20	IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 5*01	IGHJ4*0 1	ARVGRVAPFDY	132	11	6
	IGHV3_2N*F 134	IGHD6- 6*01	IGHJ1*0 1	AKSPWQSSSF EYFE F	133	16	4
25	IGHV3_2N*F 134	IGHD6- 6*01	IGHJ1*0 1	AKSPWQSTSF EYFE F	134	16	5
	IGHV3_2N*F 134	IGHD4- 1*01	IGHJ1*0 1	AKSPWQSSYFEYF EF	135	16	3
30	IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 8*01	IGHJ5- 2*02	ASVLWGLPQDDNSL DV	136	16	6
	IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 8*01	IGHJ5- 2*02	ASVLWEVPQDDNSL DV	137	16	3
35	IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 8*01	IGHJ5- 2*02	ANVLWGLPQDDNSL DV	138	16	2
	IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ASLQRLGPIDY	139	11	6
40	IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ASLQRLGPIDY	139	11	4
	IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ASLQRLGPIDY	139	11	2
45	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 4*01	IGHJ1*0 1	ASLQYFGPF EF	140	11	0
	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 4*01	IGHJ1*0 1	ASLQYFGPPDF	141	11	5
50	IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARAERAGPDFY ARAERAGPDFY	142 142	11 11	10 5
	IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1				
55	IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	ARHPHLESFDY	143	11	4
	IGHV3_45*S5 348	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	ARHPHLESFDY	143	11	2
	IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 3*01	IGHJ1*0 1	ARNYGNYGYFEF	144	12	5
60	IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 3*01	IGHJ1*0 1	ARNYGNYGYFEF	144	12	2
	IGHV1_53*S2 078	IGHD3- 3*01	IGHJ1*0 1	ATGPYWGDYYGRY FEL	145	16	2
65	IGHV1_53*S2 078	IGHD3- 3*01	IGHJ1*0 1	ATGPYWGDYYGRY FEF	146	16	2

ES 2 993 834 T3

	IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	ATERRAGPVDY	147	11	4
	IGHV4_11*S4 129	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	ATDRRAGPLDY	148	11	2
5	IGHV3_1E*F 130	IGHD1- 2*01	IGHJ5- 1*01	AGTLAGTTSFDV	149	12	11
	IGHV3_1E*F 130	IGHD1- 7*01	IGHJ5- 1*01	AGGLGRRTSFDV	150	12	14
10	IGHV4_11*S3 777	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVSGGWSTEGNFD Y	151	15	4
	IGHV4_11*S3 777	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVSGGWSTEGNFD Y	151	15	2
15	IGHV3_2N*F 134	IGHD4- 2*01	IGHJ4*0 1	AKDWIQWLHLGSYF DF	152	16	6
	IGHV3_2N*F 134	IGHD4- 2*01	IGHJ4*0 1	AKDWIQWVHLGSYF DY	153	16	3
20	IGHV4_11*S4 664	IGHD4- 1*01	IGHJ4*0 1	ARHSSTYVAPVDY	154	13	7
	IGHV4_2C*F 124	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ASAKGRLAPLDY	155	12	8
25	IGHV4_11*S5 305	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ANWADYFDY	156	9	1
	IGHV4_2C*F 124	IGHD3- 4*01	IGHJ5- 1*01	ARDPVITITRERFD V	157	16	10
30	IGHV4_11*S4 129	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARDQRTGPFDY	158	11	1
	IGHV4_11*S4 129	IGHD1- 1*01	IGHJ6*0 1	ARQAFAGPTDS	159	11	6
35	IGHV4_11*S0 762	IGHD1- 3*01	IGHJ5- 2*02	ARRGPVNWNGSSLD V	160	15	4
	IGHV3_1W*F 134	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	TRDRADSWNFHDYF DY	161	16	3
40	IGHV4_11*S5 305	IGHD6- 5*01	IGHJ4*0 1	AKIAVAGPVDY	162	11	4
	IGHV4_2C*F 124	IGHD2- 3*01	IGHJ5- 2*02	ATTYSGSDYYRLDV	163	14	6
45	IGHV1_2B*F 134	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARPD SLWGAAFDY	164	13	4
	IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ARIGAAGPGDY	165	11	11
50	IGHV4_11*S9 724	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 2*02	AKYWGDYYGYSSL DV	166	15	6
	IGHV4_11*S4 664	IGHD1- 8*01	IGHJ4*0 1	ARVEVVGPTGY	167	11	9
55	IGHV4_3M*F 133	IGHD2- 4*01	IGHJ4*0 1	ARRYSGSYSPFDC	168	13	3
60	IGHV4_11*S6 427	IGHD2- 5*01	IGHJ4*0 1	AREGMGCTGSGCSIS FDY	169	18	0
	IGHV4_11*S9 724	IGHD5- 3*01	IGHJ4*0 1	ARQGYSGYSLFDY	170	13	7
65							

ES 2 993 834 T3

	IGHV4_11*S4 664	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	ASEIAGGPVDY	171	11	3
5	IGHV4_11*S5 305	IGHD6- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARDSSGWPWDRNFD V	172	15	4
	IGHV4_11*S4 129	IGHD2- 3*01	IGHJ4*0 1	ARVTGRIAPFDY	173	12	4
10	IGHV5_1A*F 124	IGHD3- 2*01	IGHJ6*0 1	ATNIWTGYSFYGL DS	174	16	18
	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 1*01	IGHJ6*0 1	AREGRIHPLDS	175	11	31
15	IGHV3_4I*F1 30	IGHD4- 1*01	IGHJ6*0 1	AKDHDYGGGLDS	176	12	3
	IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 3*01	IGHJ4*0 1	AKKSSGSWEVDY	177	12	5
20	IGHV4_11*S5 891	IGHD3- 4*01	IGHJ5- 1*01	ARHAYYNIWTGYST NRFDV	178	19	0
	IGHV5_1A*F 124	IGHD6- 3*01	IGHJ5- 1*01	AEGSGSWNGRFGV	179	13	3
25	IGHV1_53*S2 078	IGHD3- 2*01	IGHJ5- 1*01	ATGRYYGGSYYGDR FDV	180	17	7
	IGHV3_4I*F1 30	IGHD6- 6*01	IGHJ4*0 1	AKCSSSSTGLDY	181	12	3
30	IGHV1_2B*F 134	IGHD1- 7*01	IGHJ4*0 1	ARDRSVTPFSWVEY YFDY	182	18	6
	IGHV4_5L*F 134	IGHD6- 2*01	IGHJ4*0 1	VRVVKYGPLDY	183	11	2
35	IGHV4_11*S3 915	IGHD3- 2*01	IGHJ5- 2*02	ARNPPYYNLWTGYY THSLDV	184	20	2
	IGHV4_1F*F 130	IGHD3- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVVKYGPLDY	112	11	1
40	IGHV4_11*S3 915	IGHD2- 3*01	IGHJ4*0 1	AREGYCSYTYCSNL FEF	185	17	4
	IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARARIAAPFDY	186	11	6
45	IGHV4_11*S4 664	IGHD1- 8*01	IGHJ4*0 1	ARAGRMAATDY	187	11	5
	IGHV4_11*S4 129	IGHD1- 8*01	IGHJ4*0 1	VRDVTLGPIDN	188	11	3
50	IGHV4_11*S4 129	IGHD4- 4*01	IGHJ6*0 1	AREGRIQPLDS	189	11	4
	IGHV3_4I*F1 30	IGHD1- 3*01	IGHJ4*0 1	AKCRNWDFAY	190	11	4
55	IGHV4_2C*F 124	IGHD6- 1*01	IGHJ4*0 1	ARVHRGGPFYDY	191	11	9
	IGHV4_11*S4 129	IGHD1- 1*01	IGHJ4*0 1	ARGGRVHPMDY	192	11	6
60	IGHV4_11*S4 129	IGHD3- 3*01	IGHJ4*0 1	ARGGPVSPFDY	193	11	9
65							

ES 2 993 834 T3

	IGHV4_11*S4 664	IGHD4- 2*01	IGHJ5- 1*01	ARGQRVAPFDV	194	11	8
5	IGHV5_1A*F 124	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	AKETYEDDYGYYSL GYNRFDV	195	21	2
	IGHV5_1F*F 134	IGHD1- 7*01	IGHJ4*0 1	ASAWREHLPIDY	196	12	7
10	IGHV3_1Z*F 134	IGHD3- 3*01	IGHJ6*0 1	ARDLYPGVINPSGLD S	197	16	4

Tabla 7 (Continuación). Secuencias de anticuerpos generados a partir de macacos inmunizados con VLP de RC1-4fill.

NHP5							
	VH	DH	JH	CDRH3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	Mut. de nt
15	IGHV3_3F* F132	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ARDKGSSYYQPEYFEF	198	16	9
20	IGHV3_3F* F132	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ARDKGSSYYQPEYFEF	198	16	10
	IGHV3_3F* F132	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	VRDKGSSYYQPEYFEF	199	16	7
25	IGHV4_1M* F130	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARTGKAAPVDY	200	11	11
	IGHV4_1M* F130	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARTGKAAPVDY	200	11	11
30	IGHV4_1M* F130	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARTGKAAPVDC	201	11	7
	IGHV5_1C* F130	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	AKGGDNYDSDGYDDY	202	16	0
	IGHV4_3N* F133	IGHD3- 3*01	IGHJ4* 01	ARNRGWGDLVFDY	203	13	3
35	IGHV5_1H* F132	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	AKVLSGWFWDYFDY	204	14	8
	IGHV4_11* S4664	IGHD6- 5*01	IGHJ4* 01	ARLAVAGPVDY	205	11	5
40	IGHV3_3F* F132	IGHD6- 1*01	IGHJ6* 01	ARGSSGWYGSGLDS	206	14	7
	IGHV4_1U* F130	IGHD1- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARDHIESWNKVNWFDV	207	16	7
	IGHV1_1G* F133	IGHD6- 3*01	IGHJ1* 01	ATYSGSWYAEYFEF	208	14	1
45	IGHV5_1F* F134	IGHD2- 3*01	IGHJ4* 01	AKQEDYNFWS SYFLPDY	209	17	1
	IGHV1_1G* F133	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ARDSSGWYEGFDY	210	13	1
50	IGHV1_53* S2078	IGHD3- 1*01	IGHJ4* 01	ATGRYYGPSWAIFDY	211	15	3
	IGHV4_11* S4290	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	ARDGNFGPIDY	212	11	4
55	IGHV7_1A* F124		IGHJ5- 1*01	ASGPNWFDV	213	9	7
	IGHV5_1C* F130	IGHD2- 5*01	IGHJ4* 01	AKSETDFWTSYYFNY	214	15	8
60	IGHV4_2M* F130	IGHD2- 5*01	IGHJ5- 1*01	ARDICSGSGCYWYRDN WFDV	215	20	1
	IGHV4_1T* F130	IGHD2- 1*01	IGHJ4* 01	ASNRRIAPLDY	216	11	6
	IGHV7_1A* F124	IGHD3- 1*01	IGHJ4* 01	ASGRYYFDY	217	9	5
65	IGHV3_3F* F132	IGHD4- 3*01	IGHJ1* 01	ARDRTVTPNRYFEF	218	15	8

ES 2 993 834 T3

	IGHV1_2B* F134	IGHD6- 5*01	IGHJ6* 01	ARDGPYSGGWSELDS	219	15	1
5	IGHV4_5F* F132	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARWEYSGNWGLDY	220	13	22
	IGHV4_11* S5305	IGHD6- 2*01	IGHJ3* 01	ARSTS SWPRTSD AFDF	221	16	1
	IGHV3_41*F 130	IGHD6- 2*01	IGHJ4* 01	AKKRSSWSRIDY	222	12	1
10	IGHV3_3F* F132	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ARDGSGWRRVTFDY	223	14	10
	IGHV7_1A* F124	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ATGRNYFDY	224	9	4
15	IGHV3_41*F 130	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	AKTGAVTTGFDY	225	12	4
	IGHV4_11* S0762	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	ARLVGGSGYYYYIGD	226	14	0
	IGHV3_1B* F124	IGHD6- 2*01	IGHJ4* 01	AKVPYSSWSHFDY	227	13	6
20	IGHV3_2M* F132	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	TSPRMRYSSGSFDY	228	14	3
	IGHV1_2B* F134	IGHD4- 2*01	IGHJ4* 01	ARVRGYSGYSFFDY	229	14	0
25	IGHV3_4S* F133	IGHD6- 2*01	IGHJ5- 1*01	SRGSTWSGDWFDV	230	13	7
	IGHV3_3O* F130	IGHD4- 4*01	IGHJ5- 1*01	TKRLAYSNPYNRFDV	231	15	2
	IGHV32W* F134	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	ARGGVGLDDVTTYYSGS YYYYHRTSFDY	232	27	1
30	IGHV4_2M* F130	IGHD5- 2*01	IGHJ5- 1*01	AGDRGGYNYGFTDNWF DV	233	18	5
	IGHV3_2C* F133	IGHD3- 4*01	IGHJ4* 01	TRGTAYYNFWSNSSPGY FDY	234	20	3
35	IGHV3_4V* F133	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ARDKGS SYYQPESFEE	235	16	8
	IGHV4_1N* F130	IGHD3- 1*01	IGHJ4* 01	ARRYEDDYGYYPGP NIAGTTRGVEE	236	27	6
40	IGHV4_11*F 130	IGHD6- 2*01	IGHJ3* 01	ARSTS SWPRTSD AFDF NHP 6	221	16	1
	IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFDV	237	18	4
	IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFDV	237	18	1
45	IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFDV	237	18	1
	IGHV3_45* S5257	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARGITRMITVTKTNWFDV	237	18	6
50	IGHV4_11* S5305	IGHD6- 5*01	IGHJ4* 01	ARLAVAGPFYD	238	11	5
	IGHV4_11* S5305	IGHD6- 5*01	IGHJ4* 01	ARLGVAGPLDY	239	11	2
	IGHV1_2B* F134	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	ATYKTIDY	240	8	3
55	IGHV1_2B* F134	IGHD2- 3*01	IGHJ4* 01	ASYKNIDY	241	8	1
	IGHV4_11* S9280	IGHD4- 1*01	IGHJ4* 01	ARDRHGIPFDY	242	11	2
60	IGHV1_2B* F134	IGHD3- 3*01	IGHJ4* 01	ARSRGYWGDLDFD	243	13	0
	IGHV3_45* S5348	IGHD3- 3*01	IGHJ4* 01	ARLSGWGDFRIDY	244	13	2
	IGHV1_53* S2078	IGHD2- 1*01	IGHJ5- 1*01	ATGIWFDV	245	8	4
65	IGHV3_45* S5257	IGHD2- 3*01	IGHJ4* 01	ARANNGGYFDY	246	11	6

ES 2 993 834 T3

	IGHV1_2B* F134	IGHD4- 1*01	IGHJ2* 01	ARMTTVAAFGGYFDL	247	15	5
5	IGHV7_1A* F124	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	ASGGNYADY	248	9	1
	IGHV4_11* S4664	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	ARRLSRRYFDY	249	11	0
	IGHV3_2L* F132	IGHD2- 4*01	IGHJ4* 01	TREFCSGIYCYAPFDY	250	16	0
10	IGHV1_2B* F134	IGHD3- 4*01	IGHJ5- 2*02	ASFKTLDV	251	8	3
	IGHV5_1F* F134	IGHD5- 1*01	IGHJ4* 01	AKGVGGFSYSYPHY	252	14	8
15	IGHV3_45* S5257	IGHD3- 4*01	IGHJ4* 01	ARDGHYNFWSPPGY	253	14	5
	IGHV4_11* S9724	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARAEDEDDYGSFDV	254	14	6
	IGHV4_11* S5305	IGHD6- 1*01	IGHJ3* 01	ARLGSSGWYRDDAFDF	255	16	3
20	IGHV3_1C* F124	IGHD6- 5*01	IGHJ4* 01	AKPRGRWLEDY	256	11	7
	IGHV3_1V* F124	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	TRPRQYSTGDY	257	11	0
25	IGHV3_1C* F124	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	AKMGGRGYS SYGPVFDY	258	17	2
	IGHV4_11* S4129	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	ARIVTRGPFDY	259	11	3
	IGHV3_45* S5257	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 1*01	ARDVTTRVVIDHRFDV	260	17	1
30	IGHV7_1A* F124	IGHD6- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARQLGGGQTDRFDV	261	14	3
	IGHV7_1A* F124	IGHD4- 4*01	IGHJ4* 01	ARQAYSNYPDY	262	11	3
35	IGHV3_4I*F 130	IGHD1- 8*01	IGHJ4* 01	VKLREKWETRGD	263	12	4
	IGHV5_1F* F134	IGHD4- 1*01	IGHJ5- 1*01	AKSYGSMNSRFDV	264	13	3
	IGHV4_11* S4664	IGHD3- 2*01	IGHJ4* 01	ARVIRLGPFDY	265	11	2
40	IGHV4_11* S4129	IGHD3- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARETFEGDDYGYYYTPD NWFDV	266	22	3
	IGHV3_2P* F133	IGHD6- 3*01	IGHJ4* 01	AKSGNSGSWNYFDY	267	14	9
45	IGHV3_45* S5348	IGHD3- 3*01	IGHJ4* 01	ARRRGWGDOPYFDY	268	13	1
	IGHV1_53* S2078	IGHD3- 1*01	IGHJ1* 01	ATGFSMITVALDFD	269	14	1
	IGHV4_11* S4359	IGHD3- 1*01	IGHJ4* 01	ASQGYEDDYAYWAFKF DY	270	18	1
50	IGHV4_11* S4664	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ARSPGIVAPFDY	271	12	10
	IGHV7_A*F 132	IGHD4- 1*01	IGHJ5- 1*01	ARSRSGNSSESFRDV	272	15	5
55	IGHV7_1A* F124	IGHD6- 3*01	IGHJ2* 01	ARPLYSGNWNVYWFDF L	273	17	4
	IGHV4_11* S4290	IGHD6- 1*01	IGHJ4* 01	ARDGWGGWTIDY	274	12	3
	IGHV4_11* S9724	IGHD4- 1*01	IGHJ4* 01	ARSGYGSGGTFDY	275	13	4
60	IGHV1_53* S2078	IGHD2- 3*01	IGHJ4* 01	ATTPGYCSSTYCRFDY	276	16	0
	IGHV1_53* S2078	IGHD3- 2*01	IGHJ1* 01	ATKNYYDSGYHLSGEYF EF	277	19	4
65	IGHV3_4I*F 130	IGHD1- 2*01	IGHJ5- 1*01	AQCPEYSWNMGWFDV	278	15	2

ES 2 993 834 T3

5	IGHV4_11* S3915	IGHD3- 2*01	IGHJ5- 1*01	ASPFYGSYYTRRFDV	279	16	9
	IGHV4_5B* F133	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 1*01	ARDGYYSGDYYRHNWF AV	280	18	5
	IGHV4_11* S4290	IGHD2- 1*01	IGHJ4* 01	ARDCVDAFDY	281	10	0
	IGHV1_53* S2078	IGHD1- 3*01	IGHJ4* 01	ATGYNWNDPFDY	282	12	2
10	IGHV5_1E* F133	IGHD3- 3*01	IGHJ5- 1*01	TKVEGGYWGDYHRFDV	283	16	5

Tabla 8. Uso del gen Lambda.

		IGLV124*4	IGLV3-21*01 Homo
15		IGLV124*4	93,8
		IGLV3-21*01 Homo	93,8
		IGLV132*15	IGLV2-8*01 Homo
20		IGLV132*15	90,6
		IGLV2-8*01 Homo	90,6

Tabla 9. Secuencias de anticuerpos que contienen motivos DSS generados a partir de macacos inmunizados con VLP de RC1-4fill.

NHP 1						
	VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	Mut. de nt
30	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHV	286	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNSLSAWV	287	11	2
35	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSVRV	288	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNSLSARV	289	11	4
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNSLSXQV	290	11	6
40	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	5
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	7
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	1
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDNSLSAHV	291	11	3
45	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	1
	IGLV124*30	IGLJ1*01	LSYDSSLSAHI	293	11	10
	IGLV124*30	IGLJ1*01	LSYDSSLSAHI	293	11	12
50	IGLV124*43	IGLJ3*01	QVWDSSSDHPL	294	11	2
	IGLV124*43	IGLJ3*01	QVWDSSSDHPL	294	11	1
	IGLV124*30	IGLJ2*01	GAWDSSLSAGL	295	11	27
	IGLV124*41	IGLJ3*01	SAWDSSLSVDL	296	11	2
55	IGLV132*20	IGLJ3*01	AAWDDSLSGVL	297	11	4
	IGLV124*30	IGLJ2*01	ETWDYSLNGPL	298	11	21
	IGLV124*24	IGLJ6*01	YSGDDNNDV	299	9	2
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSGHI	300	11	2
60	IGLV130*2	IGLJ6*01	QTWTTDV	301	7	82
	IGLV130*2	IGLJ3*01	CSYTTSNTLL	302	10	2
	IGLV124*30	IGLJ3*01	ETWDYSLNGPL	298	11	22
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSVHYI	303	12	2
65	IGLV130*31	IGLJ2*01	SSYASSSTWV	304	10	1

ES 2 993 834 T3

NHP 5						
	VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	LONGI TUD (AA)	Mut. de nt
5	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	3
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	3
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSALL	306	11	3
10	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVF	307	11	3
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	4
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSARL	308	11	5
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSNVL	309	11	1
15	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSGVL	310	11	4
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNL SAVL	311	11	3
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNNLSAVL	312	11	7
20	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAQV	313	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	3
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	3
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	6
25	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSYLSAGL	316	11	9
30	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	3
	IGLV132*9	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	13
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	2
35	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDNL SDDV	317	11	3
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	5
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSALV	318	11	1
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNL SAHVL	319	12	3
40	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSFDSL NLSIHL	320	12	4
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAHVL	321	12	1
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAHVL	321	12	3
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	1
45	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	7
	IGLV132*39	IGLJ3*01	DSWDSGGTHVL	323	11	29
	IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLSGPV	324	11	1
50	IGLV132*11	IGLJ3*01	QVWDSRSDHPL	325	11	8
	IGLV124*38	IGLJ1*01	MIWHNNASI	326	9	4
	IGLV132*43	IGLJ2*01	WLYYSGGHGL	327	10	4
	IGLV130*33	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	8
55	IGLV130*21	IGLJ6*01	QVWDSSSDHHDV	328	12	4
NHP 6						
	VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	Mut. de nt
60	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNL SAWV	287	11	4
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	4
65	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLRAQV	329	11	7

ES 2 993 834 T3

	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	10
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAQV	313	11	0
5	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSHDSSLTAGL	330	11	3
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	5
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSHDSSLSAGL	331	11	2
	IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLKGWV	332	11	10
10	IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLSGWV	333	11	3
	IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLNGWV	334	11	4
	IGLV132*20	IGLJ2*01	AAWDDSLSGPL	335	11	3
	IGLV132*21	IGLJ2*01	MIWHNNVWA	336	9	5
15	IGLV132*21	IGLJ2*01	VIWHNNVWA	337	9	6
	IGLV132*21	IGLJ2*01	MIWHNNAWI	338	9	3
	IGLV132*21	IGLJ2*01	MIWHNNAWV	339	9	5
20	IGLV132*20	IGLJ1*01	AAWDDSLSGYI	340	11	4
	IGLV132*20	IGLJ1*01	AAWDDSLSGYI	340	11	2
	IGLV132*20	IGLJ1*01	AAWDDSLSGYI	340	11	3
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDNSLSAYI	341	11	6
25	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSILSSYI	342	11	7
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	4
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSRLSADV	343	11	13
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	3
30	IGLV132*33	IGLJ2*01	QVWDGSTKYAGL	344	12	13
	IGLV132*33	IGLJ2*01	QVWDDSTNYAGL	345	12	16
	IGLV124*30	IGLJ3*01	GAWDSSLSALL	346	11	20
35	IGLV124*30	IGLJ3*01	GAWDSSLSALL	346	11	20
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSIDL	347	11	4
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAQL	348	11	1
	IGLV132*21	IGLJ3*01	MIWHEDDFVL	349	10	24
40	IGLV130*33	IGLJ2*01	GAWDSSLSAHWV	350	12	28
	IGLV132*39	IGLJ3*01	DSWDSSGTHVL	351	11	24
	IGLV132*15	IGLJ1*01	SSYVGSPTYI	352	10	6
	IGLV132*15	IGLJ2*01	SSYAGSGTGL	353	10	2
45	IGLV130*2	IGLJ2*01	CSYTTSNTLI	354	10	4
	IGLV124*17	IGLJ2*01	QVWDISSDHPV	355	11	2
	IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSSSAHPV	356	11	1
50	IGLV124*17	IGLJ3*01	QVWDSSSDHPL	294	11	6
	IGLV130*33	IGLJ1*01	QSYDSSLSAHYI	357	12	9
	IGLV132*29	IGLJ2*01	QSADSSGNHWV	358	11	23
	IGLV132*27	IGLJ6*01	QTWTTGIHV	359	9	75
55	IGLV124*3	IGLJ2*01	GSYRTGATFL	360	10	17
	IGLV124*6	IGLJ1*01	SSYAGSNTFI	361	10	2
	IGLV132*11	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	7
60	IGLV130*33	IGLJ3*01	QSYDGSLSAQL	363	11	11
	IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSDHPL	364	9	3
NHP 8						
	VH	JH	CDRL3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	Mut. de nt
65	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSTLSGGL	365	11	2

ES 2 993 834 T3

	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAQV	313	11	3
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGGL	366	11	1
5	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNTLSAGL	367	11	3
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSVGL	368	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	1
10	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	3
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSSLTAGL	369	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNNLSAQV	370	11	6
15	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSHDSSLSAGL	331	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	3
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSARV	371	11	5
20	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	4
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	0
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSGHL	284	11	1
25	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAHL	314	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDISLSAGL	372	11	3
30	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAGL	285	11	2
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDNILNAGL	373	11	4
	IGLV132*12	IGLJ2*01	HSYDSSLSAQV	374	11	2
35	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSSLSAWV	315	11	1
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNSLSAVL	311	11	2
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	4
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSALL	306	11	5
40	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNSLSAVI	375	11	5
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSXVL	376	11	3
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVL	305	11	0
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAQL	348	11	1
45	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSGVL	310	11	1
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSRLSALL	377	11	5
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDSSLSAVV	378	11	5
50	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNSLSAVL	311	11	2
	IGLV132*12	IGLJ3*01	QSYDNSLSALL	379	11	3
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	4
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	4
55	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSALV	318	11	1
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	4
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSADV	292	11	5
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	1
60	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSXXXHV	380	11	3
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSLSAHV	286	11	2
	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSSLSTHV	381	11	9
65	IGLV132*12	IGLJ6*01	QSYDSSSLTADV	382	11	4
	IGLV 132*1	IGLJ1*01	SSYAGSNTYI	383	10	1

ES 2 993 834 T3

	IGLV 132* 15	IGLJ1*01	SSYAGSGTYI	384	10	2
	IGLV 132* 15	IGLJ1*01	SSYAGSNTYI	383	10	5
5	IGLV 132* 15	IGLJ1*01	SSYAGSNTYI	383	10	6
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSRLSAHV	385	11	6
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYDSSLSAYI	322	11	4
	IGLV132*12	IGLJ1*01	QSYHSSLRAYI	386	11	5
10	IGLV124*3	IGLJ1*01	RSYRSGRTNI	387	10	4
	IGLV124*3	IGLJ1*01	CSYRSGDTLI	388	10	4
	IGLV124*3	IGLJ2*01	YSYRSGNTLV	389	10	3
	IGLV124*3	IGLJ2*01	CSYRSGSTFL	390	10	2
15	IGLV130*2	IGLJ1*01	CSYTTSSTFI	391	10	2
	IGLV130*2	IGLJ1*01	CSYTTSSTFI	391	10	2
	IGLV 132*1	IGLJ2*01	SSYAGINTLV	392	10	1
20	IGLV 132* 15	IGLJ2*01	SSYAGSNTFL	393	10	9
	IGLV 132* 17	IGLJ3*01	DSWDSSGTHVL	351	11	15
	IGLV132*39	IGLJ3*01	DSWDSSGTHVL	351	11	28
	IGLV124*4	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	1
25	IGLV124*4	IGLJ2*01	QVWDISSDHPV	355	11	5
	IGLV130*21	IGLJ6*01	QVWDSSSDHPV	394	11	2
	IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	0
	IGLV130*21	IGLJ1*01	QVWDSSNDHYI	395	11	2
30	IGLV132*37	IGLJ2*01	AAWDDRLSGWV	396	11	1
	IGLV132*2	IGLJ2*01	CSYTSGSTWV	397	10	4
	IGLV 132* 17	IGLJ6*01	DSWDSSGTLV	398	10	29
35	IGLV124*30	IGLJ2*01	LSYDSSLSAGL	399	11	12
	IGLV132*33	IGLJ3*01	QVWDSSSDHVL	400	11	3
	IGLV 132*_11	IGLJ1*01	QVWDNSSDHYI	401	11	10
	IGLV130*21	IGLJ2*01	QVWDSSCK	402	8	2
40	IGLV132*29	IGLJ2*01	QSADSSGNHWV	358	11	24
	IGLV124*30	IGLJ1*01	SAWDSSLSAYI	403	11	33
	IGLV132*12	IGLJ2*01	QSYDSRLRVNWW	404	12	2
	IGLV130*2	IGLJ3*01	CSYTTSNTLL	302	10	3
45	IGLV130*21	IGLJ3*01	QVWDSSSDHVL	400	11	1
	IGLV124*30	IGLJ2*01	GAWDSSLSAGL	295	11	19
	IGLV132*11	IGLJ2*01	QVWDSSSDHWV	362	11	5
50	IGLV130*35	IGLJ2*01	EAWDRSLSAWV	405	11	34
	IGLV124*30	IGLJ1*01	DTWDNSLNGYI	406	11	20

55

60

65

Tabla 10. Anticuerpos del GC de macaco con CDRL3 que se asemejan a los CDRL3 de los iGL de bNAb contra el parche de glicano V3.

ANTI CUERPO	FOR MATO	CEN LLH SP	VH	DH	JH	mut de nt	CDRH3	SEQ ID NO:	LEN GT H (AA)	VL	JL	mut de nt	CD RL3	SEQ ID NO:	LONGITUD (AA)	V3-GL ESPEC. POR	METODO
874	Fab	LN 1	IgHV3 2N*F 134	IgH D6- 6*0 1	IgHJ 1*0 1	5	AKSPWG QSTSFEY FEF	134	16	IgLV 124*4 3	IgLJ 3*0 1	1	QV WD SSS DHP L	294	11	SI	OCTET/SP R/crío-ME
876	Ig	LN 1	IgHV3 2N*F 134	IgH D6- 6*0 1	IgHJ 1*0 1	4	AKSPWG QSSSFEY FEF	133	16	IgLV 124*4 3	IgLJ 3*0 1	2	QV WD SSS DHP L	294	11	SI	ELISA
890	Ig	LN 1	IgHV1 2B*F 134	IgH D1- 7*0 1	IgHJ 4*0 1	6	ARDRSVT PFSWVEY YFDY	182	18	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	7	QSY DSS LSA GL	285	11	SI	ELISA
890	Fab	LN 1	IgHV1 2B*F 134	IgH D1- 7*0 1	IgHJ 4*0 1	6	ARDRSVT PFSWVEY YFDY	182	18	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	7	QSY DSS LSA GL	285	11	SI	OCTET

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

893	Ig	LN	1	IgHV1_53 *S2.078	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 1*0 1	2	ATGPYW GDYYGR YFEL	145	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	3	QSY DNS LSA HV	291	11	SI	ELISA
893	Fab	LN	1	IgHV1_53 *S2.078	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 1*0 1	2	ATGPYW GDYYGR YFEL	145	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	3	QSY DNS LSA HV	291	11	SI	OCTET
897	Ig	LN	1	IgHV1 _11*T5 305	IgH D6- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	4	ARDSSG WPWDNR FDV	172	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	6	QSY DNS LSA QV	433	11	SI	ELISA
897	Fab	LN	1	IgHV1_11 *S5 305	IgH D6- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	4	ARDSSG WPWDNR FDV	172	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	6	QSY DNS LSA QV	433	11	SI	OCTET/SP R/cito-ME
901	Fab	LN	1	IgHV5 _1A*F 124	IgH D3- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKETYED DYGYS LGYNRFD V	195	21	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	5	QSY DSS LSA GL	285	11	SI	OCTET
933	Ig	LN	8	IgHV7 _1A*F 124	IgH D1- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	5	ARLGEYS WNSIGYF DY	407	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	2	QSY DSS LSA HL	314	11	SI	ELISA

934	Ig	LN	8	IgHV3 3F*F1 32	IgH D1- 8*0 1	IgHJ 4*0 1	10	ARGGY SGRVFDD	408	14	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	10	QSY DSS LSG HL	284	11	SI	ELISA
935	Ig	LN	8	IgHV4 3I*F1 32	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	2	ARHSGW GDPYLD V	409	13	IgLV 132*1 1	IgLJ 2*0 1	11	QV WD SSS DH wv	362	11	SI	ELISA
936	Ig	LN	8	IgHV4 6G*F 124	IgH D6- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	14	AINSGSW NYFDY	410	13	IgLV 130*2 1	IgLJ 6*0 1	11	QV WD SSS DHP V	394	11	SI	ELISA
937	Ig	LN	8	IgHV3 1T*F 132	IgH D1- 2*0 1	IgHJ 1*0 1	1	TSDPATY SWNEYFE F	411	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	11	QSY DNS LSA VL	311	11	SI	ELISA
938	Ig	LN	8	IgHV5 1H*F 132	IgH D6- 5*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	1	AKEDGG WSNNRV DV	412	14	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	11	QSY DSS LSA QL	348	11	SI	ELISA
986	Fab	LN	8	IgHV5 1F*F1 34		IgHJ 5-	3	AKRGY NRFDV	413	11	IgLV 130*2 1	IgLJ 1*0 1	11	QV WD SSN	395	11	SI	ELISA

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

987	ig	LN	8	IgHV7 1A*F 124	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	8	VRQGYSS WYNSLD V	414	14	IgLV 130*2 1	IgLJ 3*0 1	2	QV WD SSS DH VL	400	11	SI	ELISA
987	Fab	LN	8	IgHV7 1A*F 124	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	8	VRQGYSS WYNSLD V	414	14	IgLV 130*2 1	IgLJ 3*0 1	2	QV WD SSS DH VL	400	11	SI	ELISA
988	ig	LN	8	IgHV3 4J*F1 32	IgH D5- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	18	ARDMRDI AAGGYT YGYFDY	415	19	IgLV 130*2 1	IgLJ 2*0 1	2	QV WD SSC K	402	8	SI	ELISA
988	Fab	LN	8	IgHV3 4J*F1 32	IgH D5- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	18	ARDMRDI AAGGYT YGYFDY	415	19	IgLV 130*2 1	IgLJ 2*0 1	2	QV WD SSC K	402	8	SI	ELISA
990	ig	LN	8	IgHV3 3F*F1 32	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	10	VRDPSITP GPSYNRF DV	416	17	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	4	QSY DSS LSA HV	286	11	SI	ELISA

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

990	Fab	LN	8	IgHV3 _3F*F1 32	IgH D6- 2*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	10	VRDPS/ITP GPSYNRF DV	416	17	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	4	QSY DSS LSA HV	286	11	SI	ELISA
992	Ig	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKGYVG STNRFDV	417	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	1	QSY DSS LSG HL	284	11	ND	ELISA
992	Fab	LN	8	IgHV5 _1F*F1 34	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKGYVG LTNRFDV	418	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	1	QSY DSS LSG HL	284	11	ND	ELISA
996	Ig	LN	8	IgHV3 _3O*F 130	IgH D3- 4*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	5	TKEGGPE YYNWT GWNRF V	419	20	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	1	QSY DSS LSA LV	318	11	SI	ELISA
997	Ig	LN	8	IgHV4 _3M*F 133	IgH D2- 3*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	2	AGGYLLF PLGYNSL DV	420	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	1	QSY DSS LSA HV	286	11	SI	ELISA
997	Fab	LN	8	IgHV4 _3M*F 133	IgH D2- 3*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	2	AGGYLLF PLGYNSL DV	420	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	1	QSY DSS LSA HV	286	11	SI	OCTET

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

1998	Fab	LN	8	IgHV5 1F*F1 34	IgH D1- 2*0 1	IgHJ 3*0 1	1	AKGGPP SWNDPF DF	421	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	3	QSY DSS LSA WV	315	11	ND	ELISA
1000	Fab	LN	8	IgHV5 1F*F1 34	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	4	AKNGPPY WGMGDY	422	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	2	QSY DSS LSA GL	285	11	SI	ELISA
1000	Ig	LN	8	IgHV5 1F*F1 34	IgH D3- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	4	AKNGPPY WGMGDY	422	13	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	2	QSY DSS LSA GL	285	11	SI	ELISA
1002	Fab	LN	8	IgHV5 1F*F1 34	IgH D6- 3*0 1	IgHJ 4*0 1	2	AKDRGR GGSWSL GNDY	423	16	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	4	QSY DNI LNA GL	373	11	SI	ELISA
1003	Ig	LN	8	IgHV3 1F*F1 30	IgH D3- 1*0 1	IgHJ 4*0 1	5	AKGGED DYIYYT GADY	424	17	IgLV 132*1 2	IgLJ 2*0 1	1	QSY DSS LSA WV	315	11	SI	ELISA
1004	Ig	LN	8	IgHV4 3M*F 133	IgH D3- 2*0 1	IgHJ 5- 2*0 2	3	ARGLFNF WSGYWG HNSLDV	425	19	IgLV 132*1 2	IgLJ 6*0 1	4	QSY DSS LTA DV	382	11	SI	ELISA

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

1005	Ig	LN	8	IgHV4 11°S4 970	IgH D6- 2°0 1 2	IgHJ 5- 2°0 2	14	ARDYSS WPTYNSL DV	426	15	IgLV 132°1 2	IgLJ 3°0 1	2	QSY DNS LSA VL	311	11	SI	ELISA
1013	Fab	LN	6	IgHV5 1F°F1 34	IgH D2- 1°0 1	IgHJ 4°0 1	1	AKSTLLR RSLDY	427	12	IgLV 132°1 2	IgLJ 3°0 1	4	QSY DSS LSA VL	305	11	ND	ELISA
1053	Ig	LN	5	IgHV5 1C°F 130	IgH D2- 5°0 1	IgHJ 4°0 1	1	AKSETDF WTSYF NY	314	15	IgLV 132°1 2	IgLJ 2°0 1	2	QSY DSS LSA QV	313	11	SI	ELISA
1054	Ig	LN	5	IgHV1 28°F 134	IgH D6- 5°0 1	IgHJ 6°0 1	2	ARDGPYS GGWSEL DS	219	15	IgLV 132°1 2	IgLJ 2°0 1	1	QSY DSS LSG HL	284	11	SI	ELISA
1061	Ig	LN	6	IgHV1.53 °S2.078	IgH D2- 3°0 1	IgHJ 4°0 1	0	ATTPGYC SSTYCRF DY	276	16	IgLV 132°1 2	IgLJ 1°0 1	7	QSY DSI LSS YI	342	11	SI	ELISA
1062	Ig	LN	6	IgHV5 1F°F1 34	IgH D5- 1°0 1	IgHJ 4°0 1	4	AKGVGG FSYSYPH Y	252	14	IgLV 132°1 2	IgLJ 1°0 1	5	QSY DSS LSA YI	322	11	SI	ELISA

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

1063	Ig	LN	6	IgHV1_2B*F 134	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 2*0 1	5	ARMTTV AAFGGYF DL	247	15	IgLV 132*1 2	IgLJ 3*0 1	6	QSY DSS LSD VL	347	11	SI	5	ELISA
1064	Ig	LN	6	IgHV3_1V*F 124	IgH D4- 4*0 1	IgHJ 4*0 1	36	TRPRQYS TGDY	257	11	IgLV 124*1 7	IgLJ 2*0 1	2	QV WDI SSD HPV	355	11	SI		ELISA
1068	Ig	LN	6	IgHV1_53 *S2.078	IgH D3- 2*0 1	IgHJ 1*0 1	4	ATKNYY DSGYHLS GEYFEF	277	19	IgLV 130*3 3	IgLJ 3*0 1	11	QSY DGS LSA QL	363	11	SI		ELISA
1169	Ig	LN	8	IgHV5_1F*F1 34	IgH D2- 4*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKDGGPS GSYYG GRFDV	428	18	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY AGS NTY I	383	10	ND		ELISA
1169	Fab	LN	8	IgHV5_1F*F1 34	IgH D2- 4*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	2	AKDGGPS GSYYR GRFDV	429	18	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY AGS NTY I	383	10	ND		OCTET
1170	Ig	LN	8	IgHV1_2G*F 130	IgH D2- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	7	ARGGGH SSFDF	430	11	IgLV 132*1 1	IgLJ 2*0 1	2	SSY AGI NTL V	392	10	SI		ELISA

5	1170	Fab	LN	8	IgHV1 1P*F1 33	IgH D2- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	7	ARGGGH SSFDF	430	11	IgLV 132*1 1	IgLJ 2*0 1	2	SSY AGI NTL V	392	10	ISI	ELISA/OCT ET
10	1177	Fab	LN	6	IgHV4 5N*F 133	IgH D4- 1*0 1	IgHJ 5- 1*0 1	10	ARRSGS NSESREFD V	272	15	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY VGS GTY I	352	10	ND	ELISA/OCT ET
15	1178	Fab	LN	6	IgHV4 11*S9 280	IgH D1- 8*0 1	IgHJ 3*0 1	0	ARDSYK DSPAFDF	431	13	IgLV 124*6	IgLJ 1*0 1	2	SSY AGS NTF I	361	10	ND	ELISA/OCT ET
20	1180	Fab	LN	8	IgHV5 1F*F1 34	IgH D3- 2*0 1	IgHJ 4*0 1	5	AKDQTD LDWLLY GGFDY	432	17	IgLV 132*1 5	IgLJ 1*0 1	6	SSY AGS NTY I	383	10	SI	ELISA/OCT ET

ES 2 993 834 T3

Tabla 11. bNAb que contienen el motivo QxxDSS ("QxxDSS" descrito como la SEQ ID NO: 20).

bNAb	VH	VL	CDRL3 (MT)	SEQ ID NO:	CDRL3 (iGL)	SEQ ID NO:
PGT121	4-59	L3-21	HIWDSRVPTKWV	434	QVWDSSSDHPWW	445
PGT122	4-59	L3-21	HIWDSRRPTNWW	435	QVWDSSSDHPWW	445
PGT123	4-59	L3-21	HIYDARGGTNWW	436	QVWDSSSDHPWW	445
10-1074	4-59	L3-21	HMWDSRSGFSWS	437	QVWDSSSDHPWW	445
PGT124	4-59	L3-21	MWDSRSGFSWS	438	QVWDSSSDHPWW	445
BG18	4-4	L3-25	QSSDTSDSYKM	439		
PGT125	4-39	L2-8	GSLVGNWDVI	440	SSYAGSNXXX	446
PGT126	4-39	L2-8	SSLVGNWDVI	441	SSYAGSNXXX	446
PGT127	4-39	L2-8	SSLVGNWDVI	441	SSYAGSNXXX	446
PGT128	4-39	L2-8	GSLVGNWDVI	440	SSYAGSNXXX	446
PGT130	4-39	L2-8	SSLFGRWDVV	442	SSYAGSNXXX	446
PGT131	4-39	L2-8	SSLSGRWDIV	443	SSYAGSNXXX	446
DH270.6	1-2	L2-23	SFGGSATVV	444	SYAGSSTVI	447

Tabla 12. Cebadores de PCR.

Cadena pesada				
	Nombre del Cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:	
1era PCR	Directo	p1350	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG	448
		p1351	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	449
			CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCA	450
		p1352	G	
		p1353	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	451
			LÍDER VH5-A	TTCTCCAAGGAGTCTGT
		LÍDER VH3-A	TAAAAGGTGTCCAGTGT	453
		LÍDER VH3-		454
		AB	TAAGAGGTGTCCAGTGT	
		LÍDER VH3-C	TAGAAGGTGTCCAGTGT	455
		LÍDER VH4-D	ATGAAACATCTGTGGTTCTT	456
		LÍDER VH3-E	TACAAGGTGTCCAGTGT	457
	LÍDER VH3-F	TTAAAGCTGTCCAGTGT	458	
	Inverso	3'Sall.JH1/4/5	GCTGAGGAGACGGTGACCAG	459
		3'Sall.JH2	GCTGAGGAGATGGTGATTGGG	460
		3'Sall.JH3	GCTGAAGAGACGGTGACCCTG	461
		3'Sall.JH6	GCTGAGGAGACGGTGACGACG	462

ES 2 993 834 T3

5	2da PCR	Directo	p1355	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG	463
			p1356	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG	464
			p1357	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTTGAGCTGGTGCAG	465
10			p1358	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTCCAGCTGGTACAG	466
			p1359	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	467
15			p1360	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	468
			p1361	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG	469
20			p1362	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	468
			p1363	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG	470
25			p1364	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	471
			p1365	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG	472
30			p1366	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	473
35			p1367	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACA TTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG	474
40	Inverso	p1370	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAG GAGACGGTGACCAG	475	
		p1371	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAA GAGACGGTGACCATTG	476	
		p1372	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAG GAGACGGTGACCAG	475	
		p1373	CCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAG GAGACGGTGACCAG	477	
45	Secuenciación		RM_FWD_T4_Seq	GTAGCAACTGCAACCGGTGT	478
50	de colonias PCR	Directo	Ab-sentido	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479
		Inverso	p1354	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	480
		Secuenciación	Ab-sentido	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479
Cadena ligera (Igλ)					
55			Nombre del Cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
60	1era PCR	Directo	p1394	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG	481
			p1395	GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG	482
			p1396	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG	483
			p1397	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	484
			p1398	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG	485
			p1399	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG	486
			p1400	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	487
65		Inverso	p1401	CACCAGTGTGGCCTTGTGGCTTG	488

ES 2 993 834 T3

5	2da PCR	Directo	p1402	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTGT GGCCCAGTCTGTGCTGACKCAG	489
			p1403	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTGT GGCCCAGTCTGCCCTGACTCAG	490
			p1404	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTGT GACCTCCTATGAGCTGACWCAG	491
10			p1405	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTGT CTCSCAGCYTGTGCTGACTCA	492
			p1406	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCTGT GGCCAATTTTATGCTGACTCAG	493
			p1407	CTAGTAGCAACTGCAACCGGTTCCAA TTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG	494
15			Inverso	p1409	GGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGYG GGAACAGAGTG
20	Secuenciación		p1409	GGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGYG GGAACAGAGTG	495
25	de colonias PCR	Directo	Ab-sentido	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479
		Inverso	p1409	GGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGYG GGAACAGAGTG	495
		Secuenciación	Ab-sentido	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	479

30

35

40

45

50

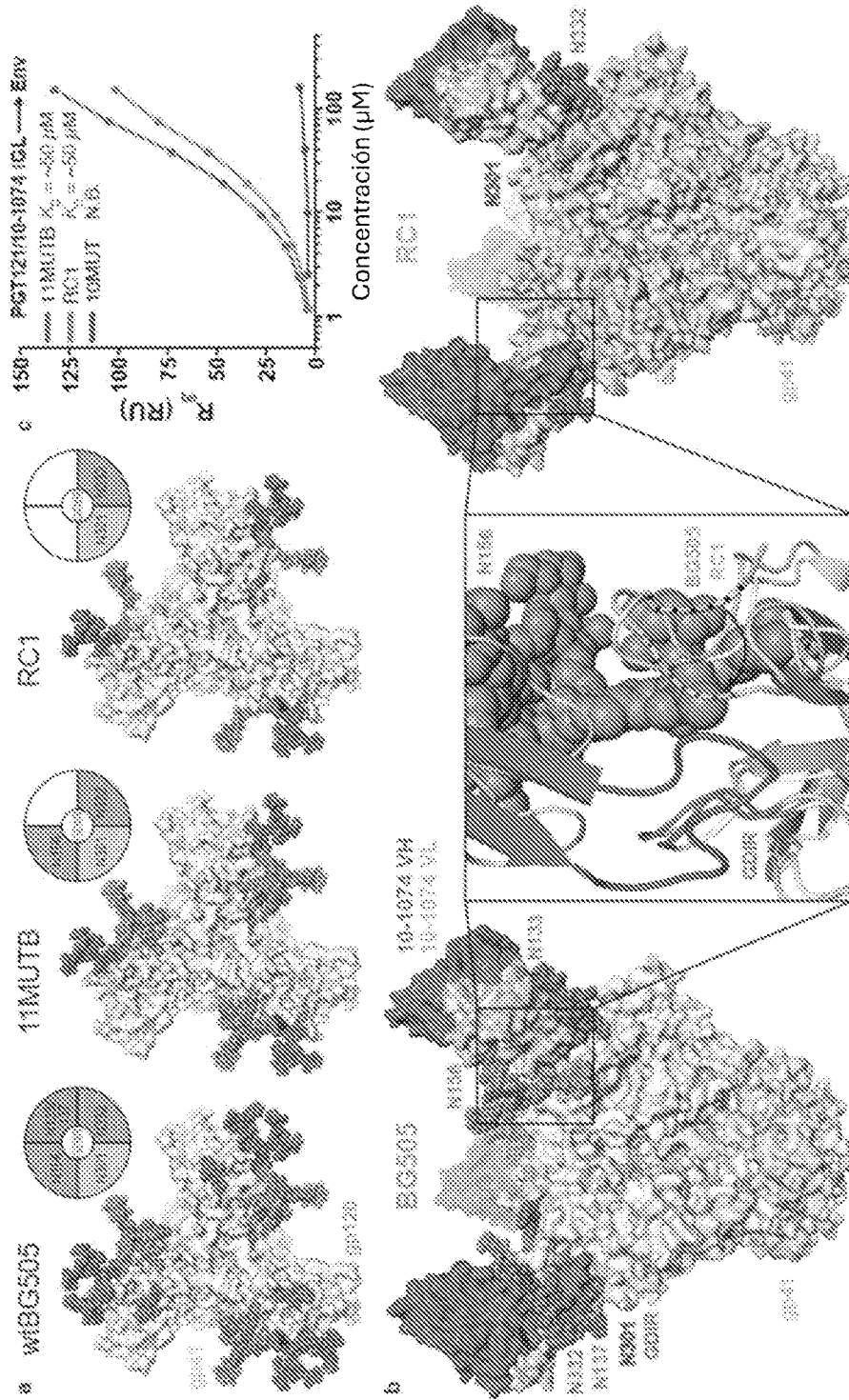
55

60

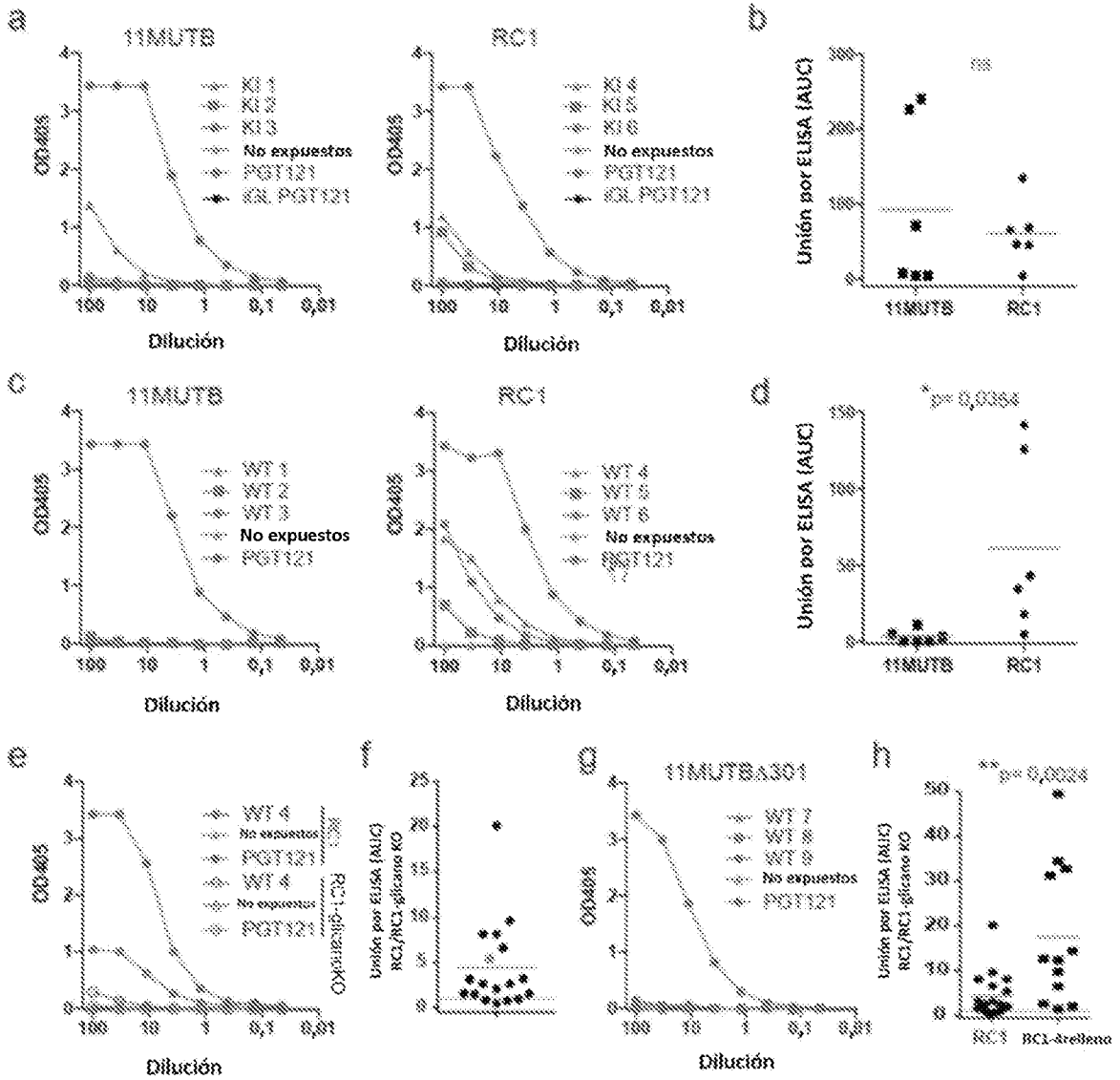
65

REIVINDICACIONES

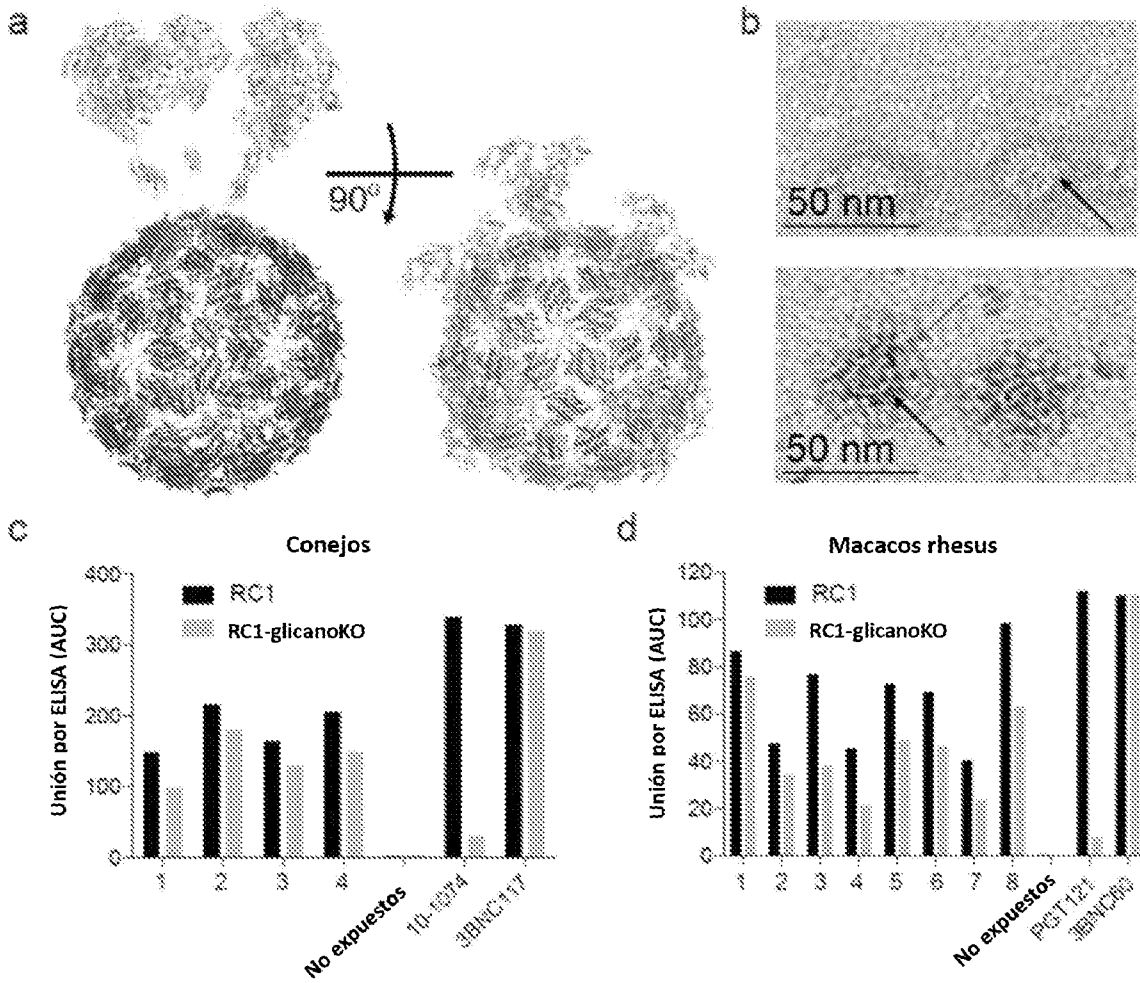
- 5 1. Un polipéptido asilado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 11 y 13.
2. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.
- 10 4. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.
5. Un complejo proteico que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 6. Una partícula similar a virus que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
7. Una composición inmunogénica que comprende (i) el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4, el complejo proteico de acuerdo con la reivindicación 5 o la partícula de virus de acuerdo con la reivindicación 6; y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4, el complejo proteico de acuerdo con la reivindicación 5 o la partícula de virus de acuerdo con la reivindicación 6, o una de sus combinaciones, para su uso en el tratamiento o prevención de la infección por VIH en un sujeto, y opcionalmente en donde al sujeto también se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antiviral.
- 25 9. Un método para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4 en un medio en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido codificado por el ácido nucleico, y purificar el polipéptido a partir de la célula cultivada o del medio de la célula.
- 30 10. Un kit, que comprende (i) una o más dosis unitarias del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4, el complejo proteico de acuerdo con la reivindicación 5 o la partícula de virus de acuerdo con la reivindicación 6; (ii) instrucciones para administrar el polipéptido, el ácido nucleico, la célula huésped, el complejo proteico o la partícula de virus; y (iii) opcionalmente un adyuvante.
- 35 11. Un método para detectar o aislar *in vitro* un anticuerpo de unión al VIH-1 en un sujeto infectado con VIH-1, que comprende:
- 40 proporcionar el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4, el complejo proteico de acuerdo con la reivindicación 5, o la partícula de virus de acuerdo con la reivindicación 6, o una de sus combinaciones;
- 45 poner en contacto la composición inmunogénica con una cantidad de fluido corporal del sujeto; y detectar la unión del anticuerpo de unión al VIH-1 al polipéptido, de esta manera se detecta o aísla el anticuerpo de unión al VIH-1 en un sujeto.
- 50
- 55
- 60
- 65



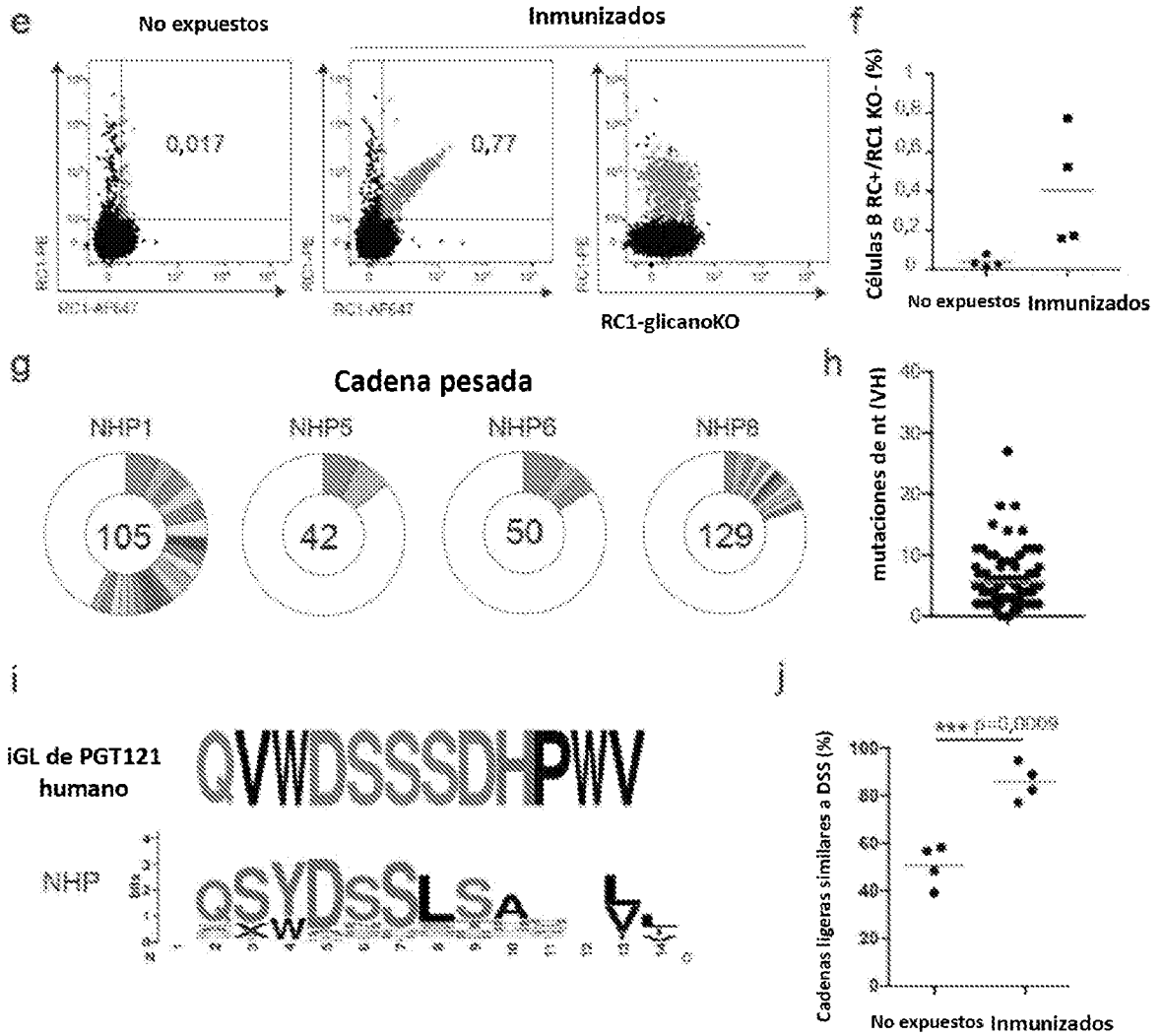
FIGURAS 1a, 1b, 1c



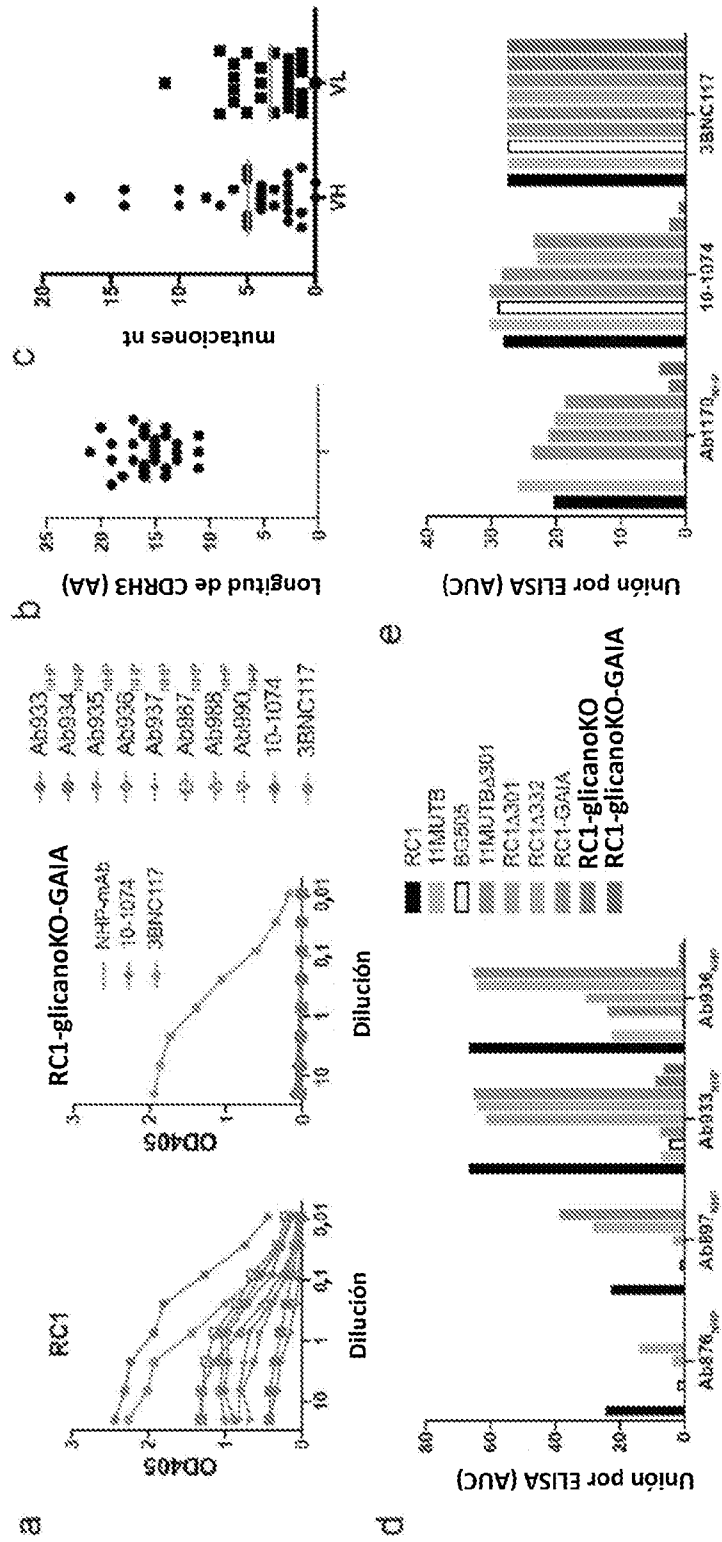
FIGURAS 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h



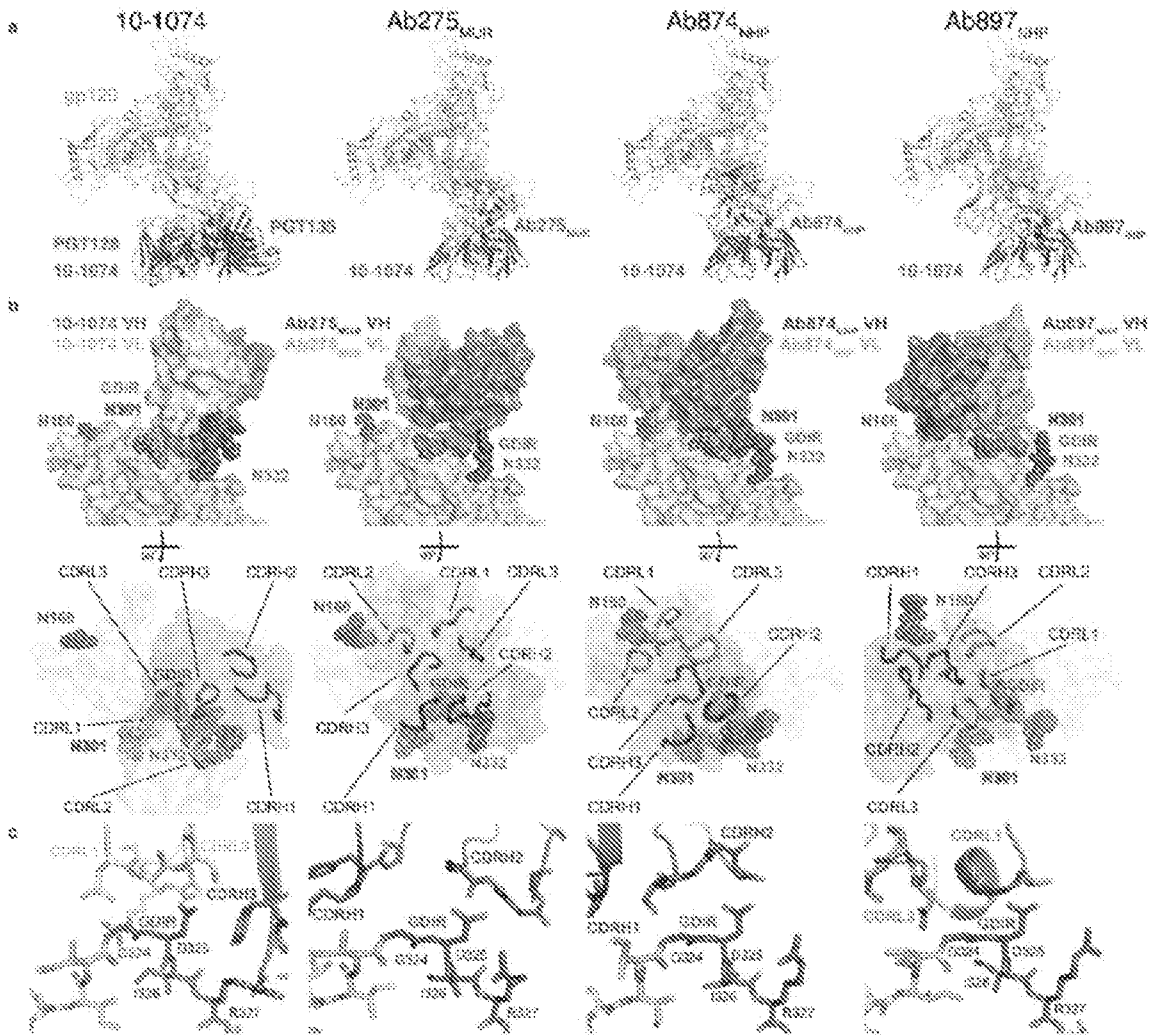
FIGURAS 3a, 3b, 3c, 3d



FIGURAS 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j



FIGURAS 4a, 4b, 4c, 4d, 4e

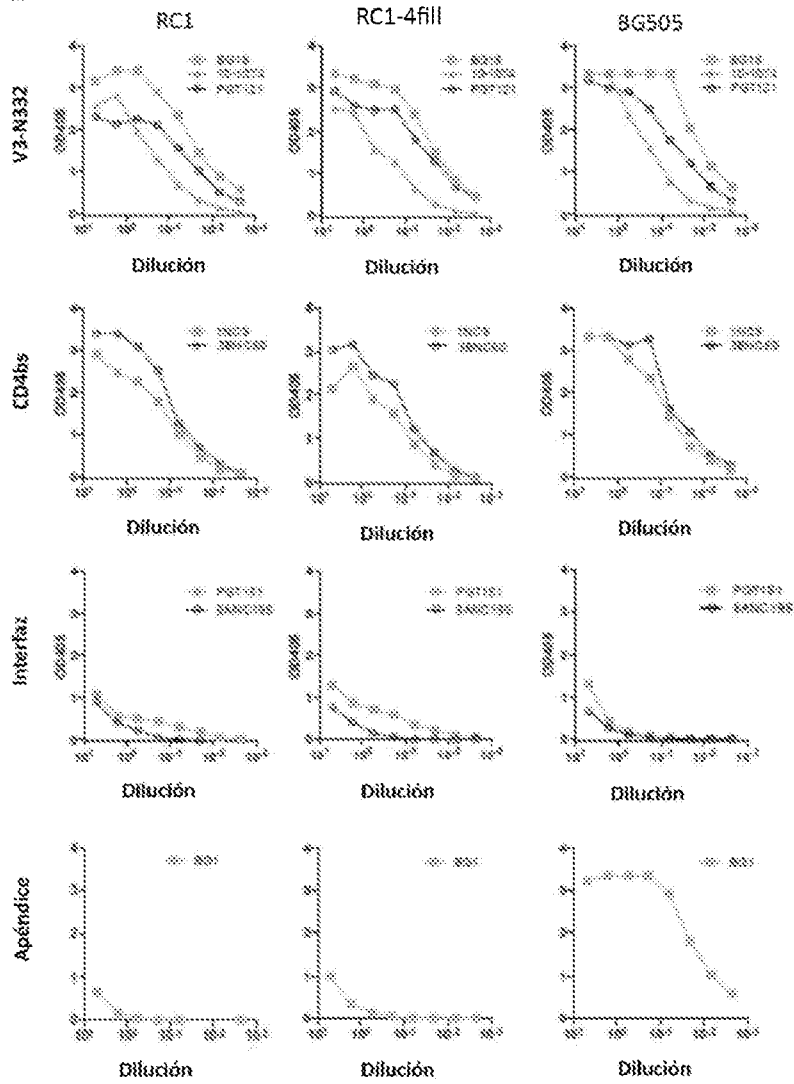


FIGURAS 5a, 5b, 5c

6a

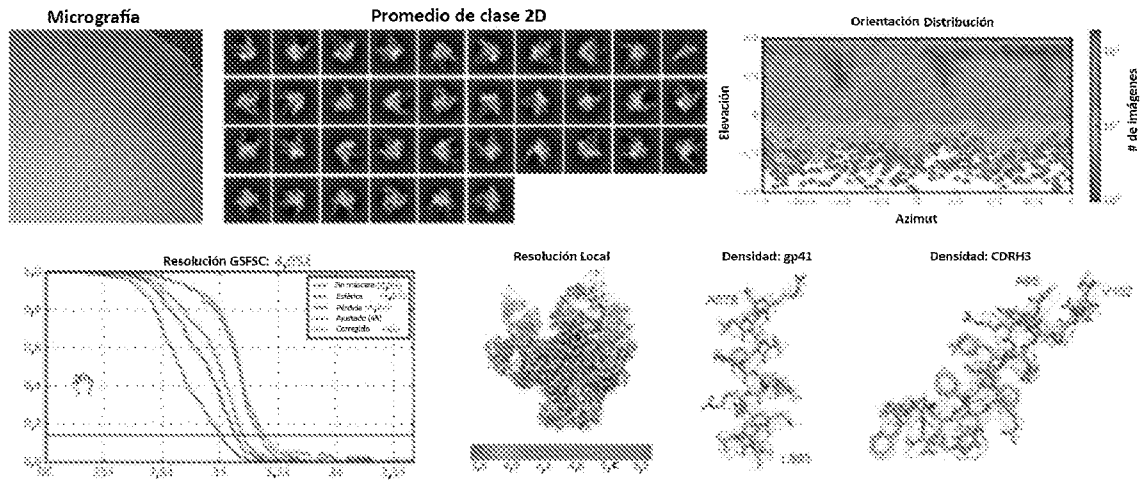
	Valores IC50 (µg/ml)		
	10-1074	PGT131	BG1
V3-N332	0,20 (n=76)	0,14 (n=170)	0,80 (n=102)
CD4bs	0,05 (n=8)	0,03 (n=8)	20,0 (n=8)
Interfaz	0,16 (n=81)	0,11 (n=173)	---
Apéndice	1,05 (n=2)	15,81 (n=6)	---
V3-N332	0,04 (n=11)	0,10 (n=34)	---
V3-N332	0,21 (n=72)	0,14 (n=145)	---

6b

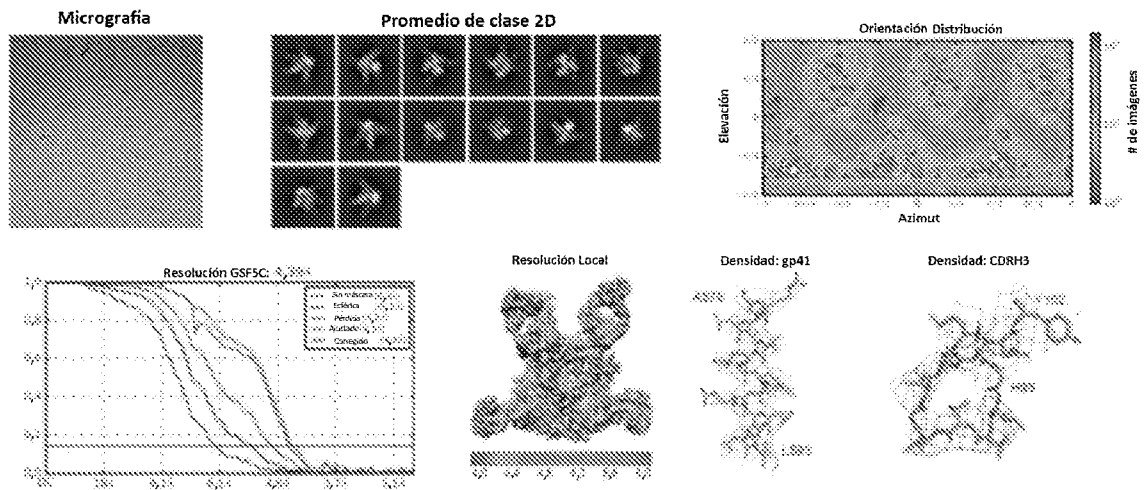


FIGURAS 6a, 6b

a) 1B-107A-RC1

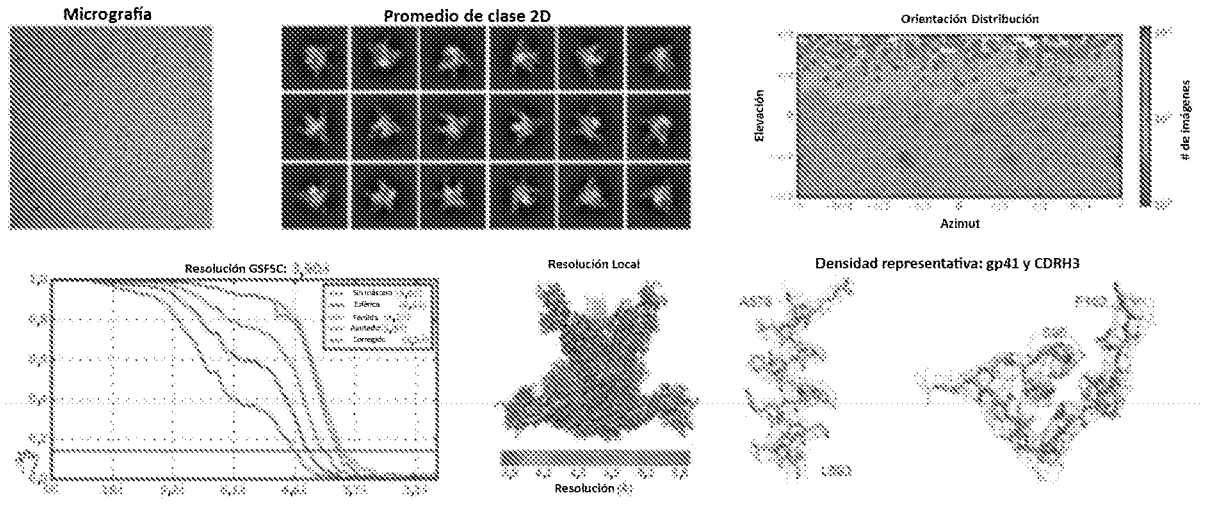


b) Ab275₁₋₁₀₀-RC1

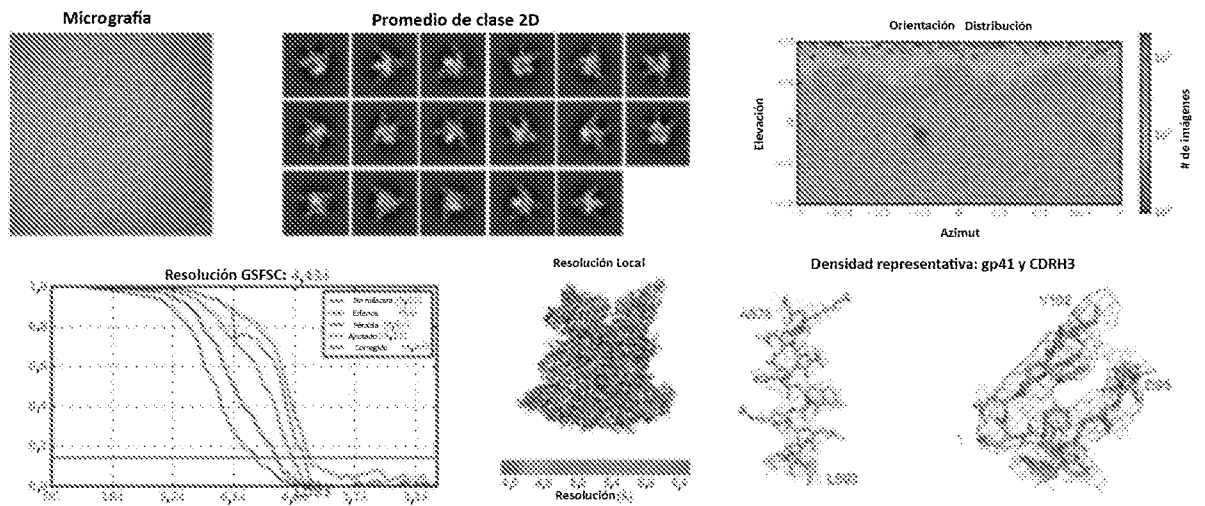


FIGURAS 7a, 7b

c. Ab674_{gag}-RC1



d. Ab897_{gag}-RC1



FIGURAS 7c, 7d

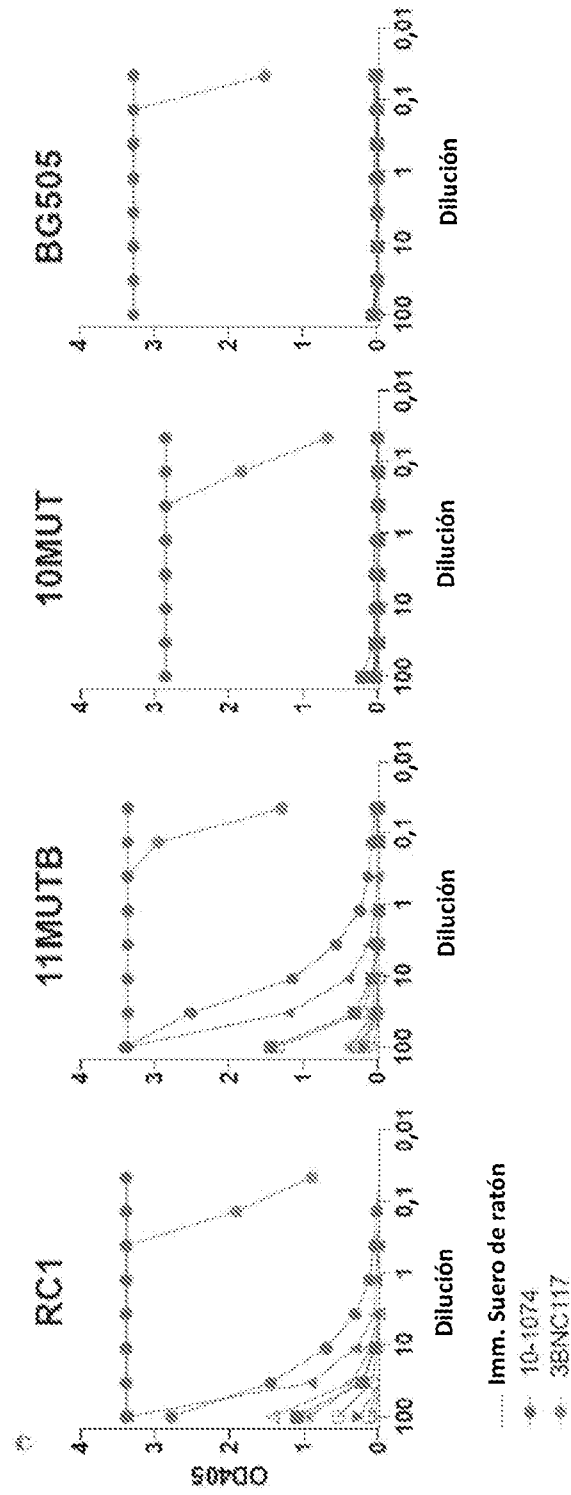
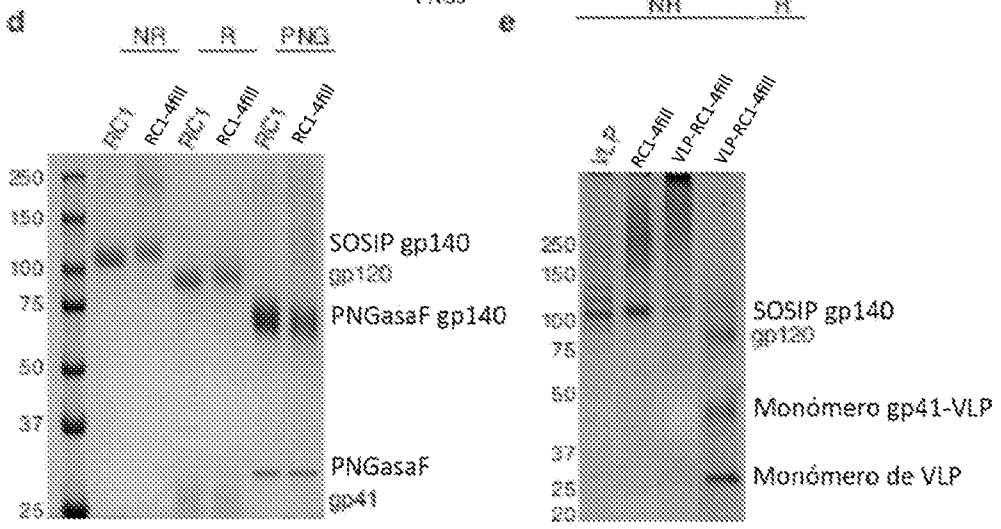
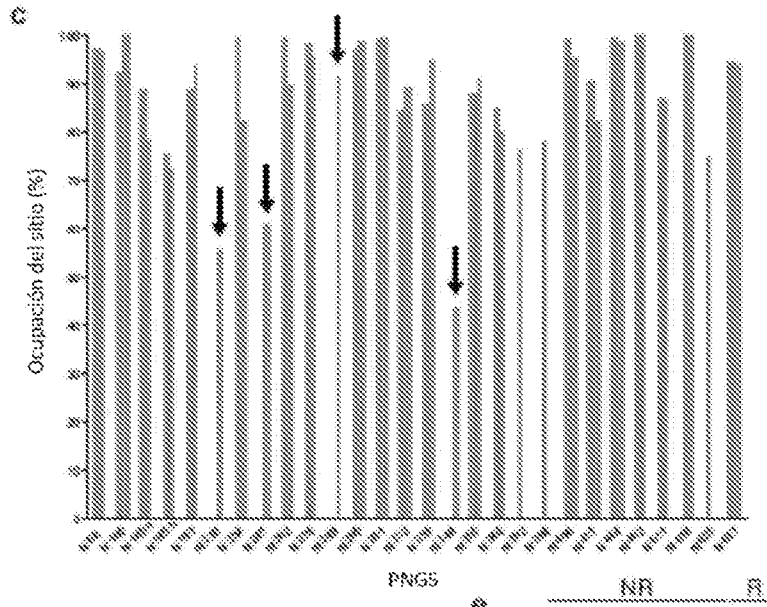
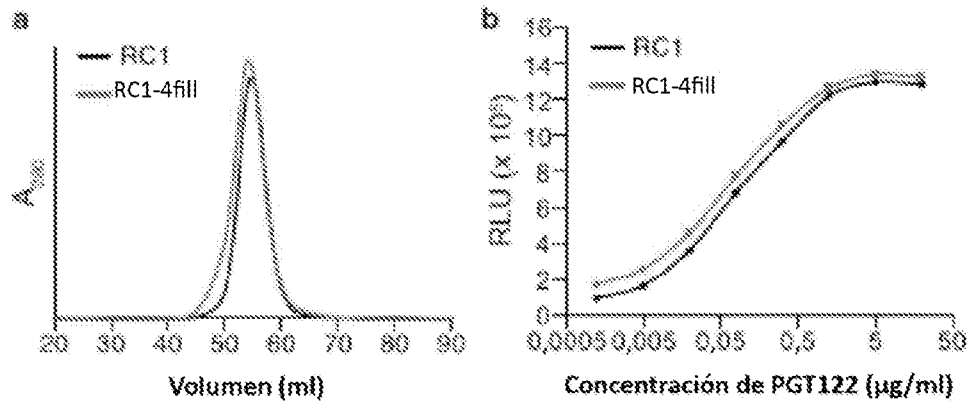


FIGURA 8



FIGURAS 9a, 9b, 9c, 9d

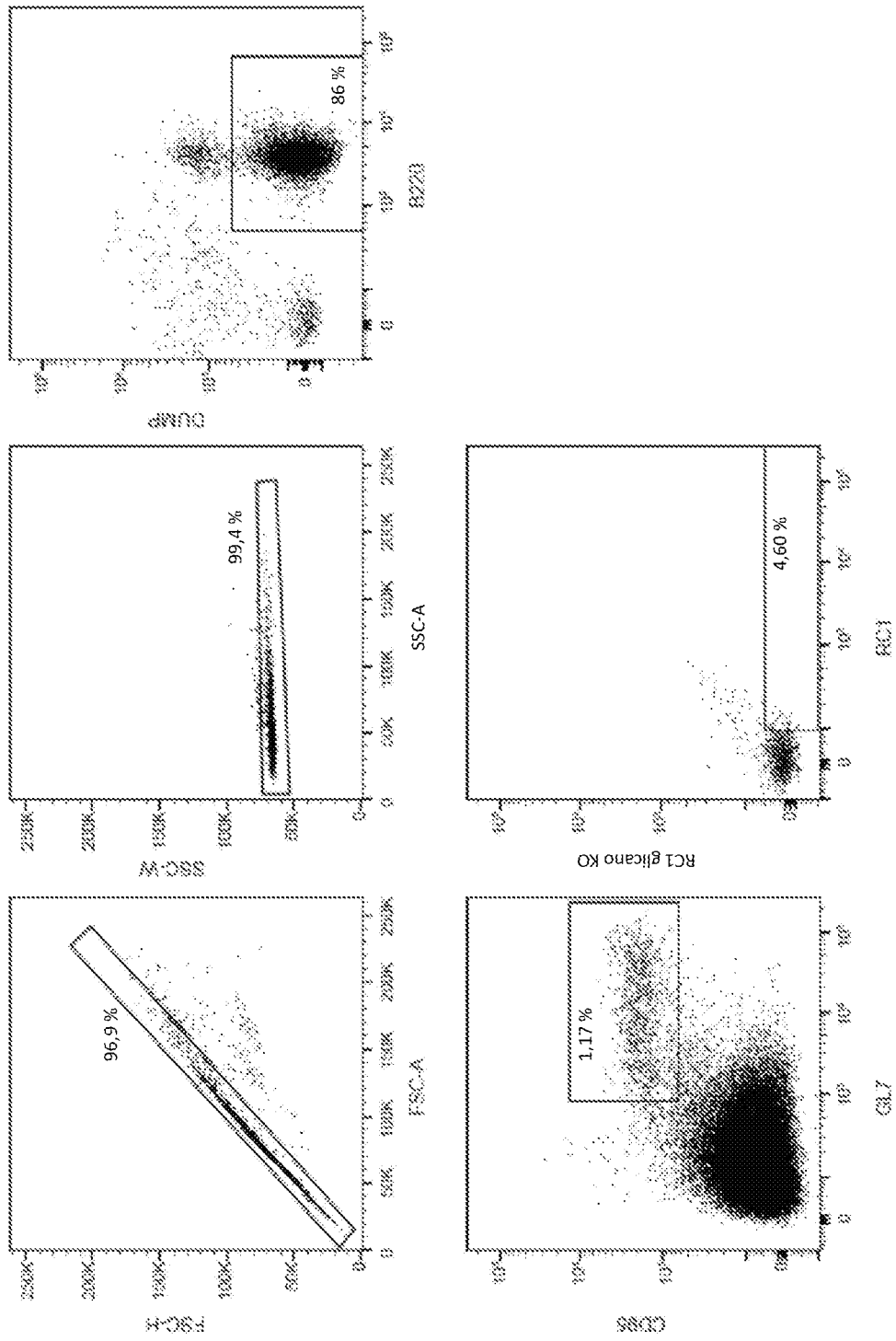
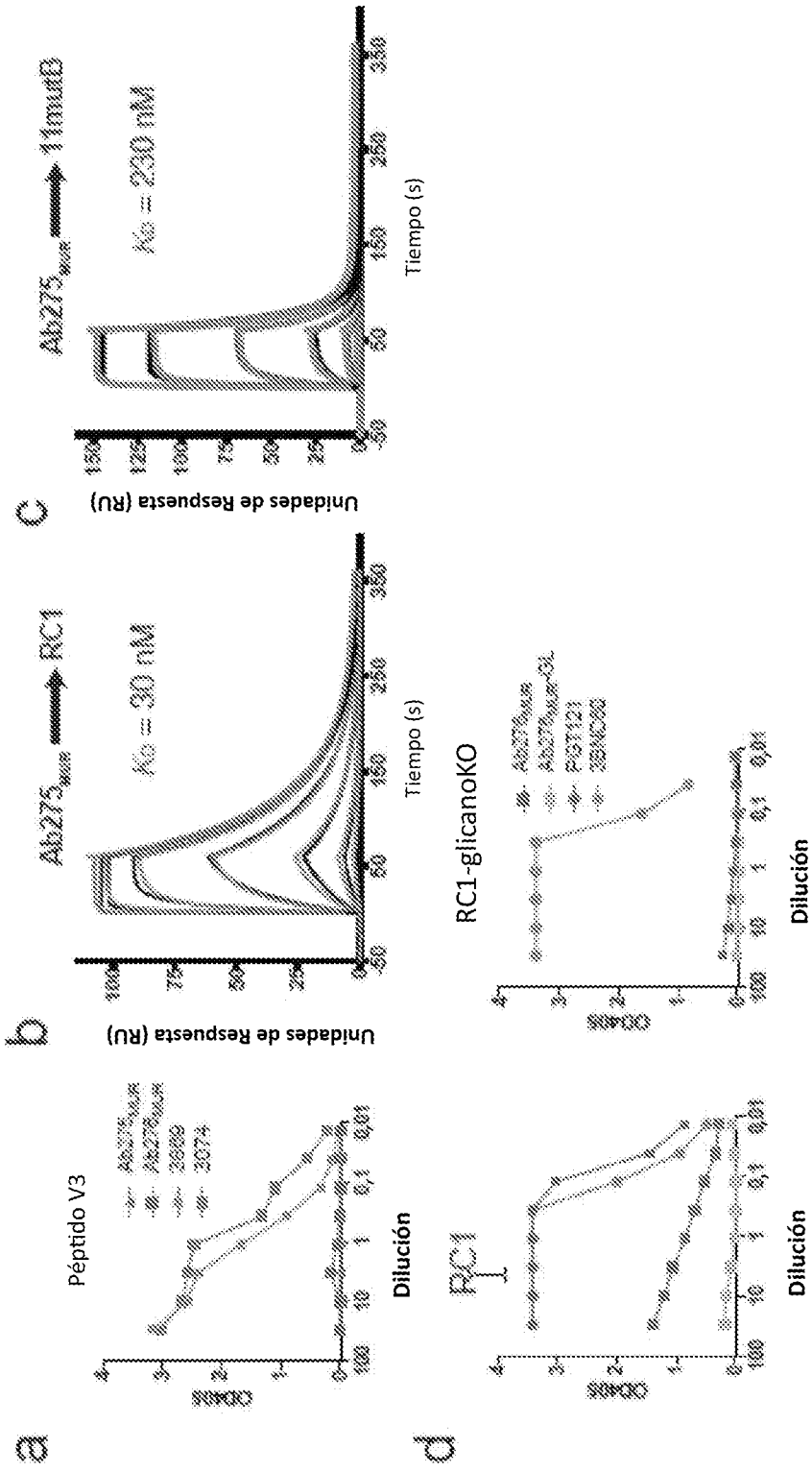


FIGURA 10



FIGURAS 11a, 11b, 11c, 11d

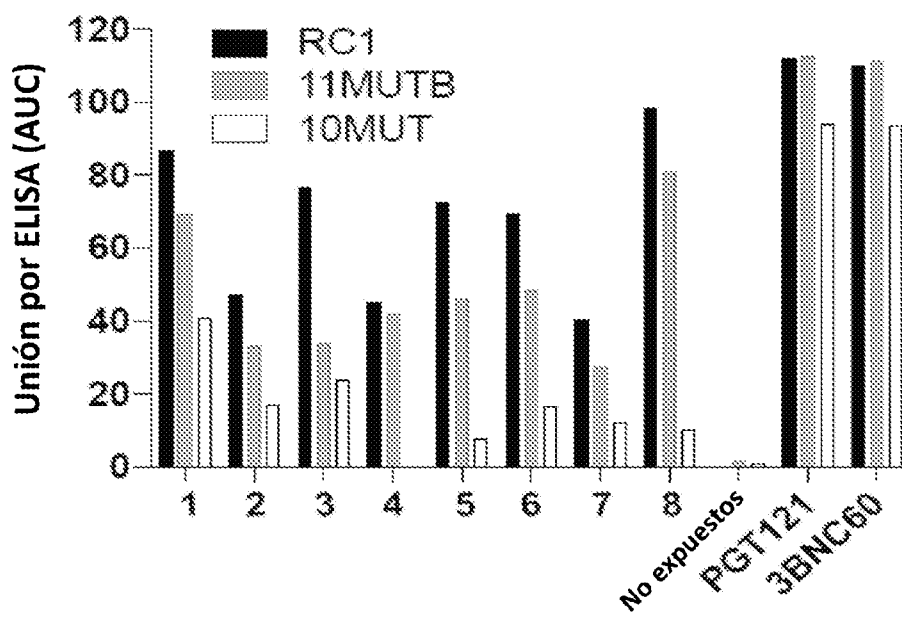
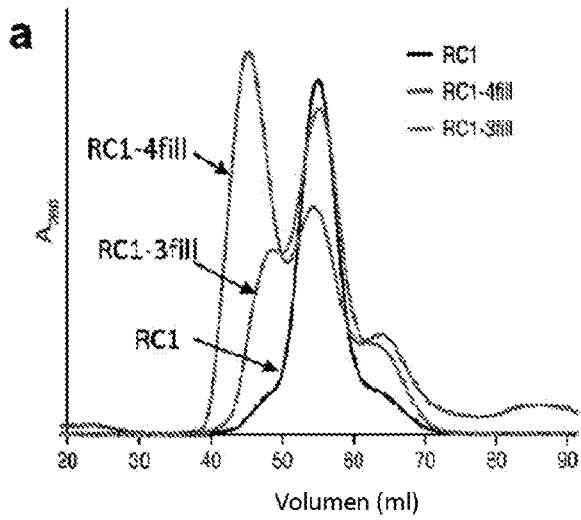
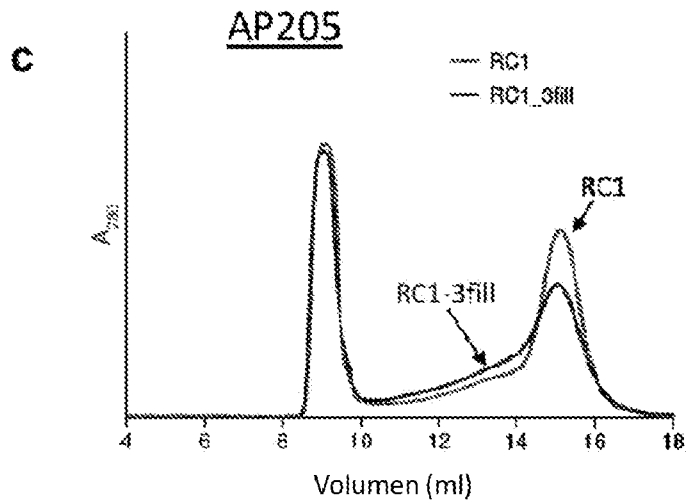


FIGURA 12



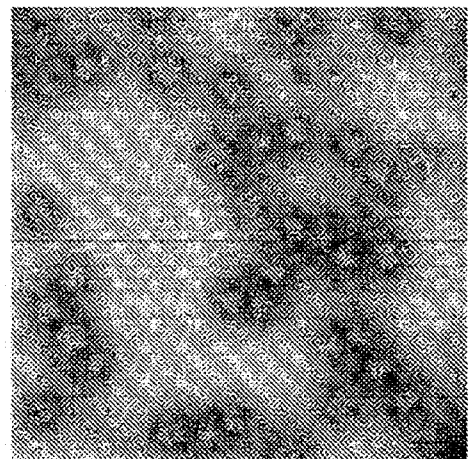
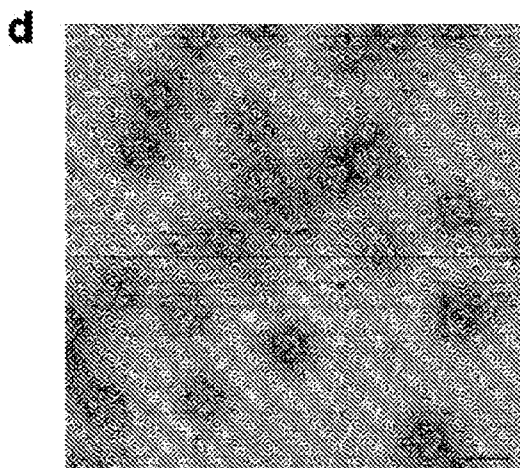
b

	<u>Rendimiento (1L) 6E</u>
RC1	15 mg
RC1-4Fill	0,25 mg
RC1-3Fill	8,6 mg

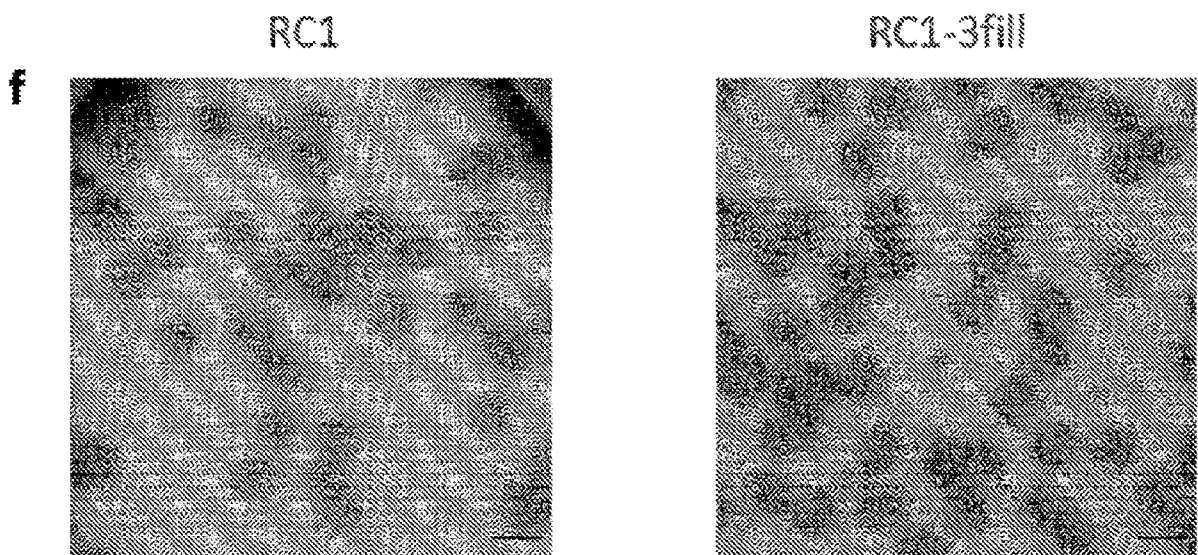
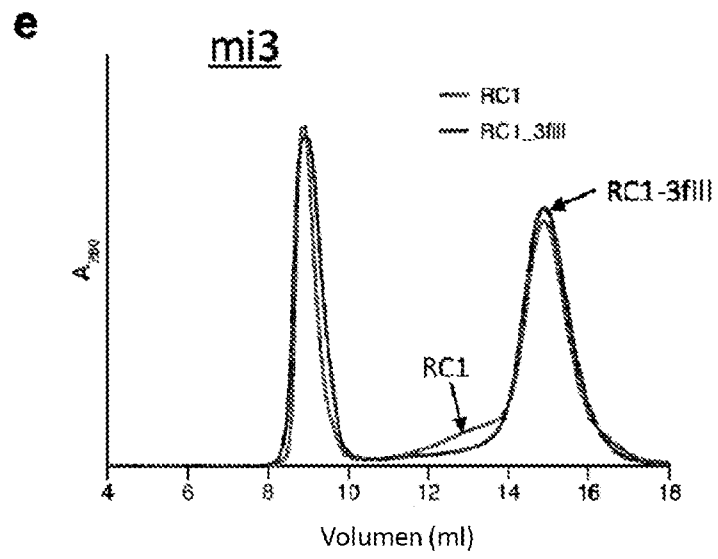


RC1

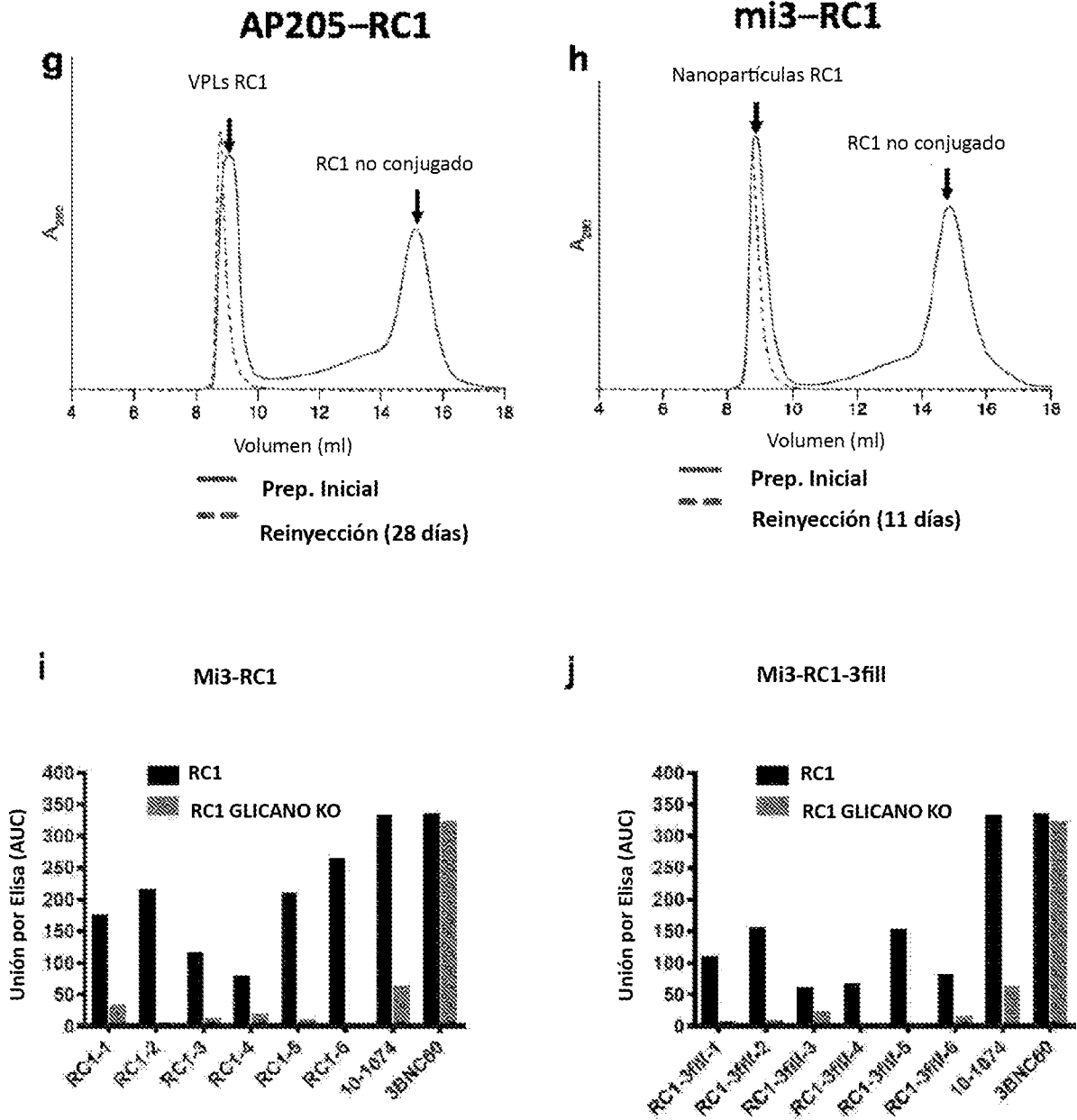
RC1-3fill



FIGURAS 13a, 13b, 13c, y 13d



FIGURAS 13e y 13f



FIGURAS 13g, 13h, 13i, y 13j