

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 512**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2015 PCT/IB2015/050870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118473**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2015 E 15707819 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3104884**

54 Título: **Un nuevo antígeno de vacuna no de VIH de la microbiota vaginal capaz de inducir una respuesta de anticuerpos protectores neutralizadores de la mucosa contra la infección por VIH**

30 Prioridad:
10.02.2014 EP 14305174

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2021

73 Titular/es:
**B CELL DESIGN (100.0%)
98 rue Charles Legendre
87000 Limoges, FR**

72 Inventor/es:
**EL HABIB, RAPHAËLLE CLAUDE;
SODOYER, RÉGIS;
CUVILLIER, ARMELLE y
MOOG, CHRISTIANE**

74 Agente/Representante:
VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 809 512 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

Un nuevo antígeno de vacuna no de VIH de la microbiota vaginal capaz de inducir una respuesta de anticuerpos protectores neutralizadores de la mucosa contra la infección por VIH

5

Sector de la técnica

La invención se refiere a un nuevo antígeno de vacuna no de VIH de la microbiota vaginal capaz de inducir una respuesta de anticuerpos protectores neutralizadores de la mucosa contra la infección por VIH y a un anticuerpo neutralizador dirigido a dicho antígeno.

10

Estado de la técnica

A pesar de treinta años de estudio, no hay ninguna vacuna contra el VIH. Los individuos no infectados expuestos al VIH son actualmente objeto de estudios intensos porque la identificación de los indicadores inmunitarios de la susceptibilidad reducida al VIH puede ofrecer pistas importantes para el desarrollo de una vacuna contra el VIH. Se planteó la hipótesis de que los anticuerpos monoclonales neutralizadores hipermutados, aislados de pacientes infectados con VIH, procedían de linajes de células B germinales progenitoras, sensibilizados inicialmente por autoantígenos o antígenos no de VIH-1 y estimulados para la respuesta específica a Env de VIH por otros inmunógenos (Haynes *et al.*, *Nature biotechnology*, 2012, 30, 423-33). A lo largo de esta línea, se ha sugerido recientemente diseñar inmunógenos de VIH que se dirijan a receptores específicos de células B de estirpe germinal (BCR; Jardine *et al.*, *Science*, 2013, 340, 711-6). Esto se consiguió mediante el "diseño inverso" de antígenos del epítipo nativo del sitio de unión de CD4 de VIH-gp120 (CD4bs-gp120) para iniciar la unión con receptores de células B de estirpe germinal. Como cabía esperar, la comparación de afinidad de diversos anticuerpos monoclonales neutralizadores hipermutados (VRC01, 12A12, 3BNC60, NIH46-45 PGV04, PGV19, PGV20, VRC-CH31) con la de su versión de estirpe germinal muestra que la afinidad del precursor de anticuerpo es de 2000 a 20000 veces menor para el dominio CD4bs-gp120 que la de las versiones hipermutadas (Hoot, S. *et al.*, *PLoS pathogens*, 2013, 9, e1003106). Por el contrario, para determinar el epítipo original reconocido por VRC01, se necesitaron varias mutaciones puntuales sucesivas del dominio CD4bs-gp120 para ajustar mejor con el BCR germinal (compuesto por una cadena pesada codificada por hVH1-2*2 sin mutar). De acuerdo con los autores, solo eventos de mutación raros que cambien la naturaleza antigénica de gp120 durante la infección generarían un epítipo capaz de activar una población de células B vírgenes, precursoras de una respuesta de anticuerpos protectores. Esta población no sería reclutada por la forma nativa de la proteína de la envoltura. La dificultad de este enfoque es rastrear la evolución histórica de los antígenos víricos durante la infección en el paciente. Además, no se demostró que los antígenos de VIH de diseño inverso fueran capaces de inducir anticuerpos neutralizadores contra el VIH mediante inmunización activa.

15

20

25

30

35

La cepa de ratón transgénico HAMIGA (patente EP 1 680 449) es una cepa de ratón transgénico humanizado que expresa IgA quiméricas humanas/murinas con regiones constantes de la cadena pesada de IgA humana (CH1 a CH3) y región variable de la cadena pesada y regiones variable y constante de la cadena ligera de ratón (VH, VL y CL).

40

Fraser *et al.* (*Science*, 1995, 270, 39-403) desvela la secuencia de nucleótidos completa del genoma de *M. genitalium* con regiones codificantes previstas, incluyendo un marcador de locus MG 468 que codifica una proteína hipotética de permeasa de transportador ABC (número de registro de GenBank AAC72488.1). Butt *et al.* (*Infection, Genetics and Evolution*, 2012, 112, 53-62) desvela la identificación de proteínas transmembrana previstas de *M. genitalium* que son de interés por su potencial como candidatas de vacuna contra la infección por *M. genitalium*. Los inventores han demostrado que un anticuerpo IgA monoclonal aislado de ratones transgénicos HAMIGA humanizados inmunizados con una permeasa truncada recombinante de *Mycoplasma genitalium* (fragmento 431 a 875 de proteína permeasa de transportador ABC de *M. genitalium*, número de registro de GenBank AAC72488.1 o SEQ ID NO: 1), un patógeno potencial del tracto genital, es capaz de neutralizar aislados primarios de VIH-1. Este es uno de los anticuerpos monoclonales neutralizadores del VIH-1 raros inducidos por inmunización activa (Nishiyama, Y. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 30627-30642; Sreepian, A. *et al.*, *Journal of Immune based Therapies and Vaccines*, 2009, 7, 5) y el primero en ser inducido por un antígeno independiente del VIH-1. Todos los demás se han aislado de pacientes infectados con VIH (McCoy, L. E. y Weiss, R. A. *The Journal of Experimental Medicine*, 2013, 210, 209-223). Las características de este anticuerpo IgA y la naturaleza del inmunógeno sugieren que la respuesta inmunitaria natural a la microbiota genital (comensales y/o patógenos) puede contribuir a la resistencia natural a la infección por VIH.

50

55

Objeto de la invención

A la vista de estos resultados, La proteína permeasa de *Mycoplasma genitalium* (SEQ ID NO: 1) representa un candidato prometedor para iniciar un protocolo de vacuna anti-VIH basado en su capacidad para sensibilizar clones de células B, capaces de reconocer adicionalmente antígenos de VIH nativos.

60

La invención es como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

65

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un antígeno de permeasa de *Mycoplasma genitalium* o a un polinucleótido que codifica dicho antígeno en forma expresable, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la

infección por VIH, en donde dicho antígeno de permeasa comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y que comprende un epítipo reactivo de forma cruzada con el epítipo de ectodominio de VIH-gp41, y en donde dicho antígeno induce anticuerpos antipermeasa neutralizadores del VIH y reactivos de forma cruzada con el VIH. En la siguiente descripción, a menos que se especifique de otro modo, permeasa de *Mycoplasma*, permeasa de *M.* o permeasa se refieren a la proteína permeasa de *M. genitalium* de la SEQ ID NO: 1. La permeasa de *Mycoplasma genitalium* es el producto del marcador de locus MG 468 (complemento de las posiciones 570994 a 576345 en la secuencia del genoma de *Mycoplasma genitalium* G37, número de registro de GenBank L43967.2). La secuencia de aminoácidos de la permeasa de *M. genitalium* corresponde al número de registro de GenBank AAC72488.1 o la SEQ ID NO: 1.

La secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 corresponde a una proteína permeasa truncada (restos 431 a 875 de la secuencia de aminoácidos de la permeasa de *M. genitalium* SEQ ID NO: 1) incluyendo los epítopos neutralizadores reactivos de forma cruzada con el VIH del ectodominio y la cola C-terminal de gp41 de VIH.

En la siguiente descripción, se usa el código de aminoácidos de una letra convencional.

El antígeno de permeasa de *Mycoplasma* o antígeno de permeasa para su uso de acuerdo con la invención se refiere a un antígeno que comprende una proteína derivada de permeasa de *M. genitalium* de la SEQ ID NO: 1, proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y es capaz de inducir anticuerpos antipermeasa que reaccionan de forma cruzada con el VIH y neutralizan el VIH. Los anticuerpos inducidos por el antígeno de permeasa que reaccionan de forma cruzada con el VIH y neutralizan el VIH se denominan en lo sucesivo en el presente documento anticuerpos antipermeasa, anticuerpos antipermeasa neutralizadores y reactivos de forma cruzada con el VIH o anticuerpos neutralizadores y reactivos de forma cruzada con el VIH.

En particular, el antígeno de permeasa para el uso de la invención es capaz de sensibilizar clones de células B capaces de reconocer adicionalmente antígenos de VIH nativos.

El antígeno de permeasa para el uso de la invención puede ser un antígeno aislado, natural, recombinante o sintético que comprenda o que consista en la proteína permeasa de *Mycoplasma genitalium* de la SEQ ID NO: 1, o un derivado inmunogénico de la misma, tal como, por ejemplo, una variante de permeasa de *M. genitalium*, y una proteína modificada de la misma. Las variantes de la proteína permeasa de *M. genitalium* derivan de secuencias de aminoácidos de tipo silvestre mediante la introducción de una o más mutaciones (supresión, inserción y/o sustitución) en posiciones de aminoácidos específicas. Las variantes de proteína permeasa de *M. genitalium* incluyen variantes naturales resultantes del polimorfismo del gen de la permeasa de *M. genitalium*, así como de variantes artificiales. Los antígenos derivados de la proteína permeasa de *M. genitalium* para el uso de la invención son antígenos funcionales, lo que significa que son capaces de inducir anticuerpos antipermeasa, reactivos de forma cruzada con el VIH y neutralizadores de la infección por VIH.

Los anticuerpos neutralizadores y reactivos de forma cruzada con el VIH que son inducidos por el antígeno de permeasa para el uso de la invención reconocen epítopos relacionados en las proteínas permeasa de *M. genitalium* y Env del HIV.

El antígeno de permeasa para el uso de la invención que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora ampliamente neutralizadora contra la infección por VIH es útil como vacuna contra el VIH preventiva y/o terapéutica.

Las propiedades del antígeno de proteína permeasa para el uso de la invención pueden ser fácilmente verificadas mediante la técnica conocida por los expertos en la materia, tales como las que se describen en los ejemplos de la presente solicitud.

El polinucleótido que codifica el antígeno en forma expresable se refiere a una molécula de ácido nucleico que, tras la expresión en una célula o en un sistema sin células, da como resultado un antígeno funcional. El polinucleótido puede ser un polinucleótido aislado que codifique dicho antígeno, tal como el polinucleótido natural de *Mycoplasma genitalium* que codifica dicho antígeno.

El antígeno de permeasa para el uso de la invención, que es capaz de inducir anticuerpos antipermeasa reactivos de forma cruzada con el VIH y que neutralizan el VIH, comprende al menos un epítipo de célula B o de anticuerpo de permeasa de *M. genitalium*, que es un epítipo neutralizador y reactivo de forma cruzada con el VIH.

El epítipo de permeasa reacciona de forma cruzada preferentemente con un epítipo de VIH-Env, más preferentemente un epítipo de VIH-gp41.

El epítipo de permeasa puede reaccionar de forma cruzada ventajosamente con un epítipo de ectodominio de VIH-gp41 de la SEQ ID NO: 2.

Como alternativa, el epítipo de permeasa puede reaccionar de forma cruzada ventajosamente con un epítipo de cola

C-terminal de VIH-gp41. El epítipo de permeasa puede reaccionar de forma cruzada con la secuencia de aminoácidos: LVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPFSFQTHLPTPRGP (SEQ ID NO: 3) de la cola C-terminal de VIH-gp41 (posiciones 699 a 734 de gp41 de VIH, de acuerdo con el sistema de numeración de Ratner *et al.*, *Nature*, 1985, 313, 277-284), que presenta homología de secuencia con la permeasa de *M. genitalium* de la SEQ ID NO: 1, como se demuestra en los ejemplos de la presente solicitud.

El antígeno de permeasa para el uso de la invención comprende uno o más epítopos neutralizadores y reactivos de forma cruzada con el VIH, en donde cada epítipo puede ser lineal o conformacional. En algunos aspectos, el antígeno de permeasa comprende al menos dos epítopos neutralizadores y reactivos de forma cruzada con el VIH idénticos o diferentes de permeasa de *M. genitalium* unidos entre sí directamente o a través de un brazo espaciador peptídico.

El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una Secuencia Comparada que son idénticos a la Secuencia de Referencia después de alinear las secuencias e introducir huecos si es necesario, para conseguir la identidad de secuencia máxima. El porcentaje de identidad se determina entonces de acuerdo con la siguiente fórmula: Porcentaje de identidad = $100 \times [1 - (C/R)]$, en donde C es el número de diferencias entre la Secuencia de Referencia y la Secuencia Comparada a lo largo de toda la longitud de la Secuencia de Referencia, en donde (i) cada aminoácido en la Secuencia de Referencia que no tiene un aminoácido alineado correspondiente en la Secuencia Comparada, (ii) cada hueco en la Secuencia de Referencia y (iii) cada aminoácido alineado en la Secuencia de Referencia que es diferente de un aminoácido en la Secuencia Comparada constituye una diferencia; y R es el número de aminoácidos en la Secuencia de Referencia a lo largo de la longitud de la alineación con la Secuencia Comparada, contándose también cualquier hueco creado en la Secuencia de Referencia como un aminoácido.

La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de varias maneras conocidas para el experto en la materia, por ejemplo, usando programas informáticos de acceso público tales como BLAST (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-). Cuando se usa dicho software, los parámetros por defecto, por ejemplo, para la penalización por hueco y la penalización por extensión, se usan preferentemente. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10.

La secuencia del antígeno de permeasa para el uso de la invención se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4 y una secuencia que difiere de la SEQ ID NO: 4 en supresiones y/o inserciones dispersas de uno a cinco aminoácidos en dicha secuencia, sustituciones de aminoácidos y/o una supresión o supresiones N-terminales de uno o más aminoácidos en dicha secuencia. La sustitución o las sustituciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 4 se eligen ventajosamente entre sustituciones conservadoras, es decir, sustituciones de un aminoácido por otro que tiene propiedades químicas o físicas similares (tamaño, carga o polaridad), que generalmente no afectan negativamente a las propiedades antigénicas de la proteína/péptido. Más preferentemente, dicha sustitución o sustituciones conservadoras se eligen de entre uno de los siguientes cinco grupos: Grupo 1 - Restos alifáticos, pequeños, no polares o ligeramente polares (A, S, T, P, G); Grupo 2 - Restos polares con carga negativa y sus amidas (D, N, E, Q); Grupo 3 - Restos polares con carga positiva (H, R, K); Grupo 4 - Restos alifáticos, grandes y no polares (M, L, I, V, C); y Grupo 5 - Restos aromáticos grandes (F, Y, W).

El antígeno de permeasa para el uso de la invención puede ser una proteína permeasa de longitud completa o un fragmento inmunogénico de la misma. En algunas realizaciones el antígeno de permeasa comprende o consiste en una proteína de menos de 500 aminoácidos.

Los ejemplos de antígenos de permeasa preferidos para el uso de la invención comprenden una proteína que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 7.

La proteína permeasa para el uso de la invención puede comprender o consistir en aminoácidos naturales (20 aminoácidos codificados genéticamente en una configuración L y/o D) unidos a través de un enlace peptídico, así como peptidomiméticos de dicha proteína donde el aminoácido o los aminoácidos y/o el enlace peptídico o los enlaces peptídicos se han reemplazado por análogos funcionales. Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos aparte de los 20 aminoácidos codificados genéticamente. En la Tabla 1A del documento US 2008/0234183 se proporciona una lista no limitante de aminoácidos no codificados. La proteína permeasa para el uso de la invención puede ser una proteína modificada derivada de las proteínas anteriores mediante la introducción de cualquier modificación química en uno o más restos de aminoácidos, enlaces peptídicos, extremos N y/o C-terminales de la proteína, siempre que la proteína modificada sea funcional. Estas modificaciones que se introducen en la proteína mediante los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, incluyen, de manera no limitante: la sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido no proteínogénico (análogo de aminoácido o aminoácido D); la modificación del enlace peptídico, en particular con un enlace del tipo retro o retroinverso o un enlace diferente del enlace peptídico; la ciclación y la adición de un grupo químico a la cadena lateral o al extremo o los extremos de la proteína/péptido, en particular para acoplar un agente de interés a la proteína de la invención. Estas modificaciones pueden usarse para aumentar su antigenicidad, inmunogenia y/o biodisponibilidad, o para marcar la proteína/péptido. Por ejemplo, el antígeno de permeasa puede estar conjugado con un resto GPI para anclar el antígeno a la membrana celular y exponer dicho antígeno en la superficie celular.

En otro aspecto, el antígeno de permeasa para el uso de la invención es una proteína de fusión o quimérica que comprende una secuencia de aminoácidos fusionada al extremo o extremos N-terminales y/o C-terminales de una proteína permeasa que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 como se ha definido anteriormente. La longitud de la proteína quimérica no es crítica para la invención siempre que el antígeno de permeasa sea funcional. La proteína permeasa se fusiona con uno o más de otros restos de proteína/péptido, incluyendo otro antígenos o antígenos, en particular antígenos de VIH, y/u otros restos de proteína/péptido que potencien la activación de las células B, y/o el tráfico a los ganglios linfáticos, y/o aumenten la estabilidad y la biodisponibilidad, y/o permitan la purificación, detección, inmovilización, producción en sistemas de expresión, del antígeno de permeasa de la invención.

Estos restos pueden seleccionarse entre: (i) un componente proteínico de una partícula de tipo virus para exponer el antígeno de la invención en la superficie de nanopartículas de tipo virus, (ii) un resto de anclaje de membrana tal como el dominio transmembrana de una proteína transmembrana para anclar el antígeno en la superficie celular y exponer dicho antígeno en la superficie celular (iii) un resto de marcado tal como una proteína fluorescente (GFP y sus derivados, BFP e YFP), (iv) un resto indicador tal como un marcador enzimático (luciferasa), fosfatasa alcalina, glutatión-S-transferasa (GST), β -galactosidasa), (v) un resto de unión tal como un marcador de epítipo (poliHis6, FLAG, HA, myc.), un dominio de unión a ADN, un dominio de unión a hormona, un marcador de polilisina para la inmovilización en un soporte, (vi) un resto de estabilización y (vii) un resto de direccionamiento para dirigir la proteína quimérica a un tipo de célula o compartimento celular específico. Además, el antígeno de permeasa puede separarse del resto de péptido/proteína mediante un enlazador que sea lo suficientemente largo para evitar que se inhiban las interacciones entre el péptido de antígeno de permeasa y el resto de proteína/péptido. El enlazador también puede comprender un sitio de reconocimiento para una proteasa, por ejemplo, para retirar marcadores de afinidad y restos de estabilización de la proteína quimérica purificada de acuerdo con la presente divulgación.

El polinucleótido que codifica la proteína en forma expresable es ADN sintético o recombinante, ARN o una combinación de los mismos, ya sea monocatenarios y/o bicatenarios. Preferentemente el polinucleótido comprende una secuencia codificante optimizada para el hospedador en el que se expresa la proteína/péptido.

En otra realización preferida, el polinucleótido comprende o consiste en la SEQ ID NO: 5 o 6.

En otro aspecto, el polinucleótido para el uso de la invención se inserta en un vector. Preferentemente, dicho vector recombinante es un vector de expresión capaz de expresar dicho polinucleótido cuando se transfecta o transforma en una célula hospedadora tal como una célula procariota o eucariota. El polinucleótido se inserta en el vector de expresión con la orientación adecuada y el marco de lectura correcto para la expresión. Preferentemente, el polinucleótido está unido operativamente a al menos una secuencia reguladora de la transcripción y, opcionalmente, a al menos una secuencia reguladora de la traducción. Los vectores recombinantes incluyen los vectores habituales utilizados en ingeniería genética, vacunas y terapia génica, incluyendo, por ejemplo, plásmidos y vectores víricos.

En algunas realizaciones, el antígeno de permeasa o el polinucleótido que codifica dicho antígeno se incluyen en una composición inmunogénica o de vacuna, que comprende un vehículo farmacéutico aceptable, y opcionalmente, al menos un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La composición inmunogénica o de vacuna para su uso de acuerdo con la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora de la mucosa funcional contra la infección por VIH que puede medirse mediante diversos ensayos que son conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de dichos ensayos incluyen, sin limitación: ensayos de captura del virus VIH, ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) usando células efectoras polinucleares CD89+ primarias, ensayos de inhibición mediada por Fc en macrófagos, ensayos de inducción de fagocitosis de macrófagos, ensayos de inhibición de la replicación vírica, ensayos de neutralización de la infección por VIH, ensayos de agregación de virus y ensayos de inhibición de la transcripción.

En algunos aspectos, el antígeno de permeasa para el uso de la invención es un antígeno aislado. En otros aspectos, el antígeno de permeasa para el uso de la invención comprende *M. genitalium* atenuado o inactivado de células enteras vivas.

El polinucleótido que codifica dicho antígeno se inserta preferentemente en un vector de expresión.

La composición para el uso de la invención comprende una dosis terapéuticamente eficaz del antígeno/polinucleótido/vector, por ejemplo, suficiente para inducir una respuesta inmunitaria protectora específica contra el VIH, en el individuo al que se le administra. La dosis eficaz se determina y ajusta dependiendo de factores tales como la composición utilizada, la vía de administración, las características físicas del individuo en cuestión, tales como el sexo, la edad y el peso, la medicación simultánea y otros factores, que los expertos en las técnicas médicas reconocerán.

La composición se administra generalmente de acuerdo con procedimientos conocidos utilizados para la vacunación, en dosificaciones y durante períodos de tiempo eficaces para inducir una respuesta inmunitaria protectora específica

contra el VIH. La administración puede ser por inyección o por administración oral, sublingual, intranasal, rectal o vaginal, inhalación, o aplicación transdérmica. Preferentemente, la administración es por inyección intradérmica o administración intranasal, intravaginal o intrarrectal.

- 5 Los vehículos farmacéuticos son los adecuados para la vía de administración prevista, que son bien conocidos en la técnica.

10 El vehículo puede seleccionarse ventajosamente entre el grupo que consiste en: liposomas unilamelares o multilamelares, ISCOMS, virosomas, pseudopartículas víricas, micelas de saponina, sacáridos (poli(lactida-co-glicolida)) o nanopartículas y microesferas de oro. Preferentemente, la composición comprende liposomas.

15 El adyuvante puede seleccionarse ventajosamente entre el grupo que consiste en: poliI:C (poliinosina-ácido policitidílico), emulsión oleosa, sustancias minerales, extractos bacterianos, oligonucleótido que contiene CpG, saponina, hidróxido de alúmina, monofosforil-lípido A (MPLA, un agonista de TLR4) y escualeno. Preferentemente, el adyuvante es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos IgA, tal como, por ejemplo, el adyuvante poliI:C (poliinosina-ácido policitidílico). Los adyuvantes más preferidos incluyen poliI:C y MPLA. La composición se formula para la administración por varias vías. Preferentemente, la composición se formula para la inyección intradérmica o la aplicación local, más preferentemente para la administración intradérmica, intranasal, intravaginal o intrarrectal. Por ejemplo, la composición se formula en un gel para la aplicación local.

20 De acuerdo con una realización preferida de la composición para el uso de la invención, dicha composición comprende adicionalmente un anticuerpo dirigido contra dicho antígeno de permeasa; el anticuerpo forma un complejo antígeno-anticuerpo con el antígeno que tiene la ventaja de aumentar la inmunogenia del antígeno. Preferentemente, el anticuerpo es una IgA, más preferentemente una IgA humano o humanizada. El anticuerpo es ventajosamente un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, el anticuerpo es una IgA quimérica humana, tal como el anticuerpo monoclonal IgA quimérico humano C3G4 que comprende un segmento IgVH murino de la SEQ ID NO: 8, un segmento IgVL murino de la SEQ ID NO: 9, un segmento constante Ig-alfa1 humano de la SEQ ID NO: 10 y un segmento constante Ig-kappa murino de la SEQ ID NO: 11, que se desvela en los ejemplos de la presente solicitud.

30 Una composición de vacuna preferida para el uso de la invención, comprende un antígeno de permeasa de *M. genitalium* formulado en liposomas que contienen monofosforil lípido A (MPLA). Tanto los liposomas como el MPLA contribuyen como adyuvantes. Un ml de suspensión liposómica puede contener 1 mg de antígeno de permeasa de *M. genitalium* y 0,800 mg de MPLA. La composición de vacuna puede formularse en forma de un gel, para la administración por vía local, por ejemplo, por vía nasal o vaginal. El gel puede comprender Natrosol® 250 HHX al 4 % p/p (Hidroxietilcelulosa) y alcohol bencílico al 1,1 % p/p, en PBS.

40 El antígeno de permeasa o polinucleótido que codifica dicho antígeno como se ha definido anteriormente es una vacuna profiláctica y/o terapéutica, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la infección por VIH mediante la administración a un individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno de permeasa, polinucleótido y/o vector como se ha descrito anteriormente, preferentemente incluido en una composición inmunogénica o de vacuna como se ha descrito anteriormente.

45 La administración del antígeno de permeasa se usa para sensibilizar clones de células B, capaces de reconocer adicionalmente antígenos de VIH nativos. Después de la sensibilización inicial, la respuesta inmunitaria anti-VIH puede estimularse mediante la administración de un antígeno o antígenos de VIH, en particular el antígeno o los antígenos de VIH-Env. Puede usarse una mezcla de diferentes antígenos de VIH. Son antígenos de VIH preferidos el ectodominio de gp41 de VIH y/o los antígenos de la cola C-terminal.

50 El protocolo de vacunación puede comprender una sensibilización inicial con el antígeno de permeasa que comprende tres administraciones de antígeno de permeasa con un intervalo de un mes y una estimulación final con un antígeno o antígenos de VIH-1, un mes después de la última administración de antígeno de permeasa.

55 En el presente documento se desvela una preparación combinada que contiene un antígeno de permeasa, polinucleótido, vector como se describe en el presente documento y un antígeno o antígenos de VIH, en particular un antígeno o antígenos de VIH-Env, para el uso simultáneo, por separado o secuencial en la prevención y/o el tratamiento de la infección por VIH, en particular la infección por VIH-1.

60 Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo antipermeasa aislado reactivo de forma cruzada con el VIH y es neutralizador, o un fragmento funcional de dicho anticuerpo que comprende al menos el sitio de unión del anticuerpo, en donde el anticuerpo se dirige contra un antígeno de permeasa de *M. genitalium* que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y que comprende un epítipo reactivo de forma cruzada con un epítipo de ectodominio de VIH-gp41. Preferentemente, el anticuerpo es una IgA, más preferentemente una IgA humana o humanizada, tal como una IgA quimérica humana. El anticuerpo es ventajosamente un anticuerpo monoclonal. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal IgA quimérico humano producido mediante inmunización de un ratón transgénico HAMIGA (patente EP 1 680 449) con un antígeno de permeasa como se ha descrito anteriormente. Por

ejemplo, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal IgA quimérico humano C3G4 que comprende un segmento IgVH murino de la SEQ ID NO: 8, un segmento IgVL murino de la SEQ ID NO: 9, un segmento constante Ig-alfa1 humano de la SEQ ID NO: 10 y un segmento constante Ig-kappa murino de la SEQ ID NO: 11, que se desvela en los ejemplos de la presente solicitud.

5 En el presente documento se desvela un polinucleótido aislado que codifica dicho anticuerpo antipermeasa neutralizador y reactivo de forma cruzada con el VIH o fragmento funcional del mismo. El polinucleótido puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 12 o 13 que codifica el segmento IgVH de la SEQ ID NO: 8 y el segmento IgVL de la SEQ ID NO: 9, respectivamente.

10 El anticuerpo antipermeasa es un componente útil de la composición inmunogénica o de vacuna como se ha descrito anteriormente, es también una herramienta de diagnóstico complementaria para evaluar la evolución del estado inmunitario protector y la maduración de los pacientes tratados o inmunizados contra la infección por VIH, un marcador predictivo de resistencia a la infección por VIH y una herramienta para diseñar inmunógenos de VIH capaces de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizadores protectores contra la infección por VIH.

15 En el presente documento se desvela un método para la identificación de un nuevo antígeno candidato de vacuna contra un patógeno de interés, que comprende:

- 20 a) identificar un antígeno en la microbiota de la mucosa de un individuo naturalmente resistente a dicho patógeno, en particular un individuo humano, en donde el antígeno de la microbiota es de un microorganismo diferente de dicho patógeno,
 b) generar un anticuerpo contra dicho antígeno de la microbiota en a),
 25 c) someter a ensayo la actividad neutralizadora del anticuerpo obtenido en b) contra dicho patógeno, en donde una actividad neutralizadora del anticuerpo contra dicho patógeno indica que el antígeno de la microbiota es un nuevo antígeno candidato de vacuna contra dicho patógeno, para un individuo que es susceptible a dicho patógeno.

La microbiota natural puede ser de la mucosa vaginal, nasofaríngea, pulmonar o gastrointestinal.

30 El patógeno es un microorganismo que puede ser patógeno en algunos individuos pero no en otros individuos que se diferencian de los primeros por algunos factores tales como, por ejemplo, la edad, el sexo, el historial médico, el estado inmunitario y la microbiota.

35 El patógeno puede ser un virus. En algunos aspectos de dicho método, dicho patógeno es el VIH y/o dicha microbiota es de la mucosa vaginal. El anticuerpo se genera ventajosamente mediante inmunización de un ratón transgénico HAMIGA (patente EP 1 680 449) con el antígeno de la microbiota, para producir IgA quiméricas humanas dirigidas contra dicho antígeno.

40 Una actividad neutralizadora indica que el antígeno de la microbiota es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora contra dicho patógeno. La actividad de neutralización puede estar relacionada con un anticuerpo que reconoce epítomos que no pueden identificarse mediante ensayos de unión convencionales.

45 El polinucleótido para su uso de acuerdo con la invención se prepara mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, se produce mediante la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos por PCR o RT-PCR, mediante cribado de bibliotecas de ADN genómico mediante hibridación con una sonda homóloga, o bien mediante síntesis química total o parcial. Los vectores recombinantes se construyen e introducen en células hospedadoras mediante técnicas convencionales de ADN recombinante y de ingeniería genética, que se conocen en la técnica.

50 La proteína para su uso de acuerdo con la invención se prepara mediante las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, en particular mediante la expresión de un ADN recombinante en un sistema celular adecuado (eucariota o procariota) o mediante síntesis en fase sólida o líquida. Más específicamente, la proteína y sus derivados por lo general se producen a partir del ADNc correspondiente, obtenido mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia; el ADNc se clona en un vector de expresión eucariota o procariota y la proteína producida en las células modificadas con el vector recombinante se purifica por cualquier medio adecuado, en particular por cromatografía de afinidad. El péptido y sus derivados por lo general se sintetizan en fase sólida, de acuerdo con la técnica de Fmoc, descrita originariamente por Merrifield *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 85: 2149-) y se purifican mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.

60 Descripción de las figuras

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales que están dentro de la experiencia en la materia. Dichas técnicas se explican con todo detalle en la bibliografía. Además de las disposiciones anteriores, la invención también comprende otras disposiciones, que surgirán de la descripción a continuación, que se refiere a realizaciones de ejemplo del tema de la presente invención, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 5 - La figura 1 ilustra la potencia de neutralización de la infección por VIH-1 (CI90) en un ensayo de neutralización basado en CMSP de IgA sérica purificada de ratones HAMIGA inmunizados con antígeno de permeasa de *Mycoplasma genitalium* (PERM) o polipéptido de ectodominio de gp41 de VIH (GP). Se inmunizaron ratones HAMIGA (10 ratones por grupo) a través de dos vías diferentes (vía vaginal (VAG) o vía intradérmica (ID)) y con dos antígenos diferentes, un antígeno de permeasa truncado recombinante de *M. genitalium* (PERM) o el polipéptido de ectodominio de gp41 de VIH (GP). Se inmunizaron ratones HAMIGA de control (5 ratones por grupo) con Albúmina Sérica Bovina (BSA) por la vía ID. Se recogieron IgA séricas y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Se midió la actividad neutralizadora de la IgA sérica de cada ratón inmunizado contra la cepa de virus SF162 en un ensayo de neutralización basado en CMSP. La actividad neutralizadora se expresa como CI90 (concentración inhibidora del 90 %), es decir, la concentración ($\mu\text{g/ml}$) de IgA sérica purificada que provocó una reducción del 90 % de la infección por el virus VIH. Solamente las IgA séricas de ratones inmunizados con permeasa fueron capaces de presentar una potencia CI90 de neutralización de la infección por VIH-1 en el intervalo de 60 $\mu\text{g/ml}$. A pesar de una fuerte unión anti-gp41, ninguna de las IgA séricas de ratones inmunizados con polipéptido de ectodominio de gp41 fue capaz de generar una respuesta inmunitaria neutralizadora CI90.
- 10 - La figura 2 muestra la reactividad cruzada mediante ELISA de anticuerpos IgA séricos y secretores policlonales anti-permeasa de *Mycoplasma genitalium* con gp41 de VIH. Se inmunizaron ratones transgénicos HAMIGA con antígeno de permeasa (P) de *Mycoplasma genitalium* (M.g.) o polipéptido de ectodominio de gp41 (GP) mediante las vías intradérmica (ID) o intravaginal (VAG). Se analizaron anticuerpos IgA policlonales específicos anti gp41 de VIH-1 y antipermeasa de M.g. mediante ELISA en suero y secreciones vaginales de ratones preinmunes (Pre-I) y ratones inmunizados. Aunque la IgA policlonal (sérica y vaginal) de los ratones HAMIGA inmunizados con gp41 no muestra una unión significativa en la permeasa en ELISA, la IgA policlonal de los ratones HAMIGA inmunizados con permeasa de *M. genitalium* presenta una reactividad cruzada significativa contra el antígeno de ectodominio de gp41.
- 20 - La figura 3 representa el análisis por SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie del anticuerpo IgA1 κ monoclonal quimérico humano/murino neutralizante de VIH-1 C3G4. C3G4 se purificó mediante cromatografía de afinidad y las formas monoméricas y poliméricas de IgA se separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño. C3G4 contiene las dos formas, monomérica y polimérica, de una IgA1 monoclonal. L: Marcador de peso molecular. 1. Fracción total del mAb C3G4. 2. Fracción enriquecida en IgA monomérica del mAb C3G4. 3. Fracción enriquecida con IgA polimérica del mAb C3G4.
- 25 - La figura 4 ilustra la actividad de unión y neutralización de IgA1 antipermeasa de *M. genitalium* monoclonal C3G4. A. La unión de IgA total, las fracciones enriquecidas en IgA monomérica y enriquecidas con IgA polimérica de C3G4 a la permeasa de *M. genitalium* se analizó mediante ELISA usando permeasa truncada de *M. genitalium* como antígeno. B. La unión de IgA total, las fracciones enriquecidas en IgA monomérica y enriquecidas con IgA polimérica de C3G4 a gp41 de VIH se analizaron mediante ELISA usando polipéptido de ectodominio de gp41 de VIH como antígeno. C. La actividad neutralizadora de las fracciones enriquecidas en IgA monomérica e IgA polimérica de C3G4 se midió frente a las cepas de virus VIH-1/SF162 y VIH-1/QHO en un ensayo de neutralización basado en CMSP. La actividad neutralizadora se expresa como CI70 (concentración inhibidora del 70 %) y CI90 (concentración inhibidora del 90 %), es decir, la concentración (mg/ml) de fracción enriquecida monomérica o enriquecida polimérica de C3G4 que provocó una reducción del 70 % y el 90 % de la infección por el virus VIH, respectivamente.
- 30 - La figura 5 ilustra la actividad de neutralización de IgA1 antipermeasa de *M. genitalium* monoclonal C3G4 en un ensayo de neutralización basado en CMSP en nueve cepas de VIH-1. La actividad neutralizadora de la IgA1 polimérica C3G4 purificada se sometió a ensayo en diferentes cepas de laboratorio y primarias de VIH-1. La IgA1 polimérica C3G4 purificada presentó una actividad de neutralización en nueve cepas diferentes de VIH-1 con una CI80 < 18 $\mu\text{g/ml}$ contra VIH-1_{SF162}, aislados de VIH-1_{92BR025} y VIH-1_{TV1}, una CI50 < 1,8 $\mu\text{g/ml}$ frente a aislados de VIH-1_{QHO} y VIH-1_{DU174} y una CI50 < 18 $\mu\text{g/ml}$ frente a aislados de VIH-1_{KON}, HIV-1_{92UG024}, HIV-1_{89.6} y HIV-1_{RW}.
- 35 - La figura 6 representa la alineación de segmentos variables de IgH del mAb humano neutralizador de VIH VRC01 (SEQ ID NO: 17) dirigido a CD4bs-gp120 y su progenitor humano no mutado IgVH1-2*2 (SEQ ID NO: 18); anticuerpo IgA1 κ monoclonal quimérico humano/murino neutralizador del VIH-1 C3G4 (SEQ ID NO: 19) y su progenitor murino no mutado IgVH5-12 (SEQ ID NO: 20).

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: Identificación de la respuesta inmunitaria vaginal en mujeres no infectadas altamente expuestas al VIH

1. Material y métodos

1.1 Cohortes

- 65 Se investigó una cohorte de 32 mujeres no infectadas altamente expuestas al VIH (MNIAE) de parejas serodiscordantes, en colaboración con los Centros GHESKIO (Grupo haitiano para el estudio del sarcoma de Kaposi

y las infecciones oportunistas, por sus siglas en inglés) en Haití. La cohorte de control incluía 15 sujetos no infectados y no expuestos al VIH. Ninguno de los sujetos tenía el genotipo homocigótico CCR5-Delta 32 y dos eran heterocigóticos, uno en el grupo MNIAE, el otro en el grupo de control. El estudio fue aprobado por un comité ético y se obtuvo el consentimiento informado de todas las mujeres antes del muestreo.

5
1.2 *ELISA en secreciones vaginales*

Se sometieron a ensayo secreciones vaginales de MNIAE y controles para determinar respuestas de anticuerpos IgG1 e IgA específicos de gp41 de VIH mediante ELISA, como se ha descrito anteriormente (Hocini *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1997, 13, 1179-).

1.3 *Transferencia Western en secreciones vaginales*

15 Se analizaron secreciones vaginales de MNIAE y controles para determinar anticuerpos IgG1 e IgA específicos de gp160, gp110, gp41, p68, p55, p53, p40, p34 y p25 de VIH mediante transferencia Western como se ha descrito anteriormente (Hocini *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1997, 13, 1179-).

1.4 *Ensayo de inhibición de la transcitosi*

20 El ensayo de inhibición de la transcitosi se realizó como se ha descrito anteriormente (Bélec, L. *et al.* *The Journal of infectious diseases*, 2001, 184, 1412-1422).

1.5 *Clonación de regiones variables de IgG1 e IgA de células de la mucosa en vector fagémido*

25 Se construyeron bibliotecas separadas de fragmentos Fab de IgA e IgG1. Brevemente, se usaron ARN mensajeros extraídos de células de la mucosa de dos sujetos seleccionados para la amplificación por separado de regiones variables de IgG1 e IgA. Se combinaron individualmente cebadores de PCR correspondientes al extremo 5' de todas las familias de dominio variable de VH y VL con un cebador derivado del primer dominio constante de IgG1 o IgA (Persson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1991, 88, 2432-6). A continuación, los fragmentos de ADN amplificados correspondientes a cadenas pesadas y ligeras se clonaron en un vector fagémido (Persson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1991, 88, 2432-6), permitiendo la presentación en la superficie del fragmento Fab (Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 7978-82).

1.6 *Secuenciación de Fab de IgG e IgA recombinantes*

35 Se secuenciaron clones individuales, de bibliotecas tanto de IgG1 como de IgA, usando la técnica de didesoxi de Sanger convencional.

1.7 *Expresión de fragmentos Fab de IgG1 e IgA recombinantes*

40 Se expresaron fragmentos Fab recombinantes usando tanto traducción en *E. coli* (Studier y Moffat, *J. Mol. Biol.*, 1986, 189, 113-130) como sin células (Ryabova *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 1998, 77, 179-93).

1.8 *Análisis de mutaciones de VH*

45 Se analizaron mutaciones de VH de IgG1 e IgA recombinantes como se describe en Wang *et al.*, *BMC bioinformatics*, 2008, 9 Supl 12, S20.

1.9 *Identificación de epítipo de anticuerpo mediante cribado de bibliotecas de péptidos aleatorios presentados en fagos*

50 Con el fin de identificar el epítipo reconocido por el anticuerpo, el fragmento Fab de anticuerpo recombinante se cribó frente a bibliotecas comerciales de péptidos aleatorios presentados en fagos (Ph.D. -12™ Kit de bibliotecas de péptidos presentados en fagos, NEW ENGLAND BIOLABS), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Normalmente, se aplicaron de 4 a 5 rondas de selección (bioselección).

1.10 *Análisis estadístico*

60 Se usó un ensayo de ji cuadrado de Yates para analizar las muestras de la Tabla I. La diferencia entre el grupo de control y el grupo altamente expuesto al VIH es estadísticamente significativa siempre que el *valor de p* sea <0,05.

2. Resultados

65 La respuesta inmunitaria en el tracto genital de una cohorte de mujeres no infectadas altamente expuestas al VIH (MNIAE) de parejas serodiscordantes se investigó en colaboración con los Centros GHESKIO (Grupo haitiano para el estudio del sarcoma de Kaposi y las infecciones oportunistas, por sus siglas en inglés) en Haití. Se analizaron fluidos

vaginales de 32 individuos mediante ELISA y transferencia Western, y se compararon con 15 sujetos de control no infectados y no expuestos al VIH. Ninguno de los sujetos tenía el genotipo homocigótico CCR5-Delta 32 y dos eran heterocigóticos, uno en el grupo MNIAE, el otro en el grupo de control. Se sometieron a ensayo secreciones vaginales para determinar respuestas de anticuerpos IgG1 e IgA específicos contra gp41 en ELISA. Los resultados del ELISA se confirmaron mediante transferencia Western. Solamente se conservaron las muestras que mostraban una fuerte positividad con ambas técnicas para la investigación adicional y la construcción de bibliotecas de anticuerpos.

Aunque todos los sujetos eran seronegativos para la infección por VIH, el 53 % de las MNIAE dieron resultados positivos en las secreciones vaginales para IgA anti-gp41 frente a solamente el 13 % en el grupo de control ($p < 0,02$) mientras que no se observó ninguna diferencia significativa para las respuestas de IgG anti-gp41 (Tabla I).

Tabla I: Respuesta inmunitaria específica de VIH-1 en secreciones vaginales de MNIAE mediante TW y ELISA

Anticuerpo	Positivos en el grupo de control (n = 15)	Positivos en el grupo altamente expuesto al VIH (n = 32)	Valor de P
TW de IgA/gp160	0 (0 %)	3 (10 %)	NS
TW de IgA/gp110	0 (0 %)	1 (3 %)	NS
TW de IgA/p68	0 (0 %)	1 (3 %)	NS
TW de IgA/p55	0 (0 %)	2 (6 %)	NS
TW de IgA/p53	0 (0 %)	1 (3 %)	NS
TW de IgA/gp41	2 (13 %)	17 (53 %)	0,02
TW de IgA/p40	0 (0 %)	1 (3 %)	NS
TW de IgA/p34	0 (0 %)	4 (12 %)	NS
TWP de IgA/p25	1 (6 %)	2 (6 %)	NS
ELISA de IgA/gp41	3 (20 %)	9 (28 %)	NS
TW de IgG1/gp160	0	5 (16 %)	0,16
TW de IgG1/gp110	0	2 (6 %)	NS
TW de IgG1/p68	0	1 (3 %)	NS
TW de IgG1/p55	2 (13 %)	3 (10 %)	NS
TW de IgG1/p53	0	4 (12 %)	NS
TW de IgG1/gp41	2	8 (25 %)	NS
TW de IgG1/p40	0	2 (6 %)	NS
TW de IgG1/p34	0	1 (3 %)	NS
TW de IgG1/p25	0	4 (12 %)	NS
ELISA de IgG1 gp41	2 (13 %)	7 (22 %)	NS

TW: transferencia Western; NS: no significativo

La actividad funcional de las secreciones se sometió a ensayo mediante la inhibición de la transcitosión de VIH_{JRCSF}. Ninguna de las secreciones dio positivo en los ensayos funcionales de transcitosión, en comparación con el anticuerpo monoclonal ampliamente neutralizador de VIH-1 2F5 utilizado como control positivo. Por tanto, el ensayo de transcitosión no se usó más para el cribado de muestras.

Para caracterizar la respuesta de anticuerpos, se recogieron células de la mucosa con un Cytobrush de dos sujetos de tipo silvestre CCR5 seleccionados basándose en su respuesta fuerte contra gp41 en ELISA y transferencia Western y en las relaciones sexuales sin protección a largo plazo con al menos una pareja seropositiva para el VIH-1. Con el fin de evitar la amplificación de los genes de la pareja, todas las muestras positivas para el Antígeno Específico Prostático (PSA > 50 ng/ml) se desecharon.

Después de la amplificación específica, se colaron regiones variables de IgG e IgA en un vector fagémido permitiendo la expresión de fragmentos Fab en la superficie de fagos filamentosos. En una primera estrategia, se habrían seleccionado fagos que presentan una unión de Fab a un antígeno de gp41 recombinante. Se consideró que esta etapa de selección era innecesaria debido al perfil fuertemente oligoclonal observado del repertorio clonado. En una situación convencional, el análisis por secuenciación de clones escogidos al azar de la biblioteca debería proporcionar todo un conjunto de secuencias diferentes. Sin embargo, en el caso de los sujetos seleccionados, la gran mayoría de los clones eran idénticos o muy parecidos y representaban un gran porcentaje de la población total (hasta el 75 % para las cadenas de VH). Esto no se debió a un sesgo en la amplificación o la clonación, puesto que se obtuvo el mismo resultado cuando se construyeron bibliotecas independientes. Lo mismo ocurría con las bibliotecas de IgG1 e IgA. Para caracterizar adicionalmente este repertorio de mucosas oligoclonales, se expresaron fragmentos Fab correspondientes a los anticuerpos más representados como proteínas recombinantes.

IgG1 (llamada Toussaint) en asociación con 2 cadenas ligeras diferentes, IgA (llamada Makandal) en asociación con 2 cadenas ligeras diferentes, IgG1 (Jacmel) e IgA (Mangue). Las cadenas ligeras más representadas fueron de las familias k1 y λ4. Estas dos cadenas ligeras se asociaron sistemáticamente a todas las cadenas pesadas puesto que

no fue posible determinar el apareamiento de las cadenas VH/VL originales. El análisis de las mutaciones de VH mostró que Makandal tenía un perfil no mutado germinal. Con el fin de identificar el epítipo reconocido, este anticuerpo se cribó frente a bibliotecas comerciales de péptidos aleatorios presentados en fagos. En dos cribados independientes, dos péptidos superpuestos permitieron la identificación de un epítipo correspondiente a una región de la parte C-terminal de gp41: LVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLPTPRGP (SEQ ID NO: 3).

Se formuló la hipótesis de que la respuesta inmunitaria oligoclonal de la mucosa de esas mujeres podría ser responsable de su resistencia a la infección por VIH y que estos anticuerpos se indujeron en respuesta a una microbiota particular y por reactividad cruzada con el dominio gp41 de la envoltura del VIH, podría prevenir la fusión vírica. Con el fin de ver si la secuencia de aminoácidos reconocida por Fab Makandal tenía alguna homología con otras proteínas del entorno, esta secuencia se comparó con una base de datos de secuencias de proteínas, excluyendo proteínas de VIH. Los datos mostraron coincidencias muy débiles, pero de forma interesante, hubo coincidencias uniformes con secuencias de proteínas bacterianas. Entre éstas, se seleccionó una permeasa de *Mycoplasma genitalium* (número de registro de GenBank AAC72488.1 o SEQ ID NO: 1).

Ejemplo 2: El antígeno de permeasa de *M. genitalium* es capaz de inducir una respuesta sistémica y de la mucosa de anticuerpos protectores neutralizadores contra la infección por VIH en ratones HAMIGA

1. Material y métodos

1.1 Antígenos

Permeasa truncada recombinante de *M. genitalium* (rPermeasa o PERM)

Se insertó ADNc de permeasa truncada recombinante (SEQ ID NO: 6) preparado mediante síntesis génica (GeneART) en un vector de expresión procariota (pSP401, derivado de *pET28 cer* (NOVAGEN); Peubez *et al.*, *Microbial Cell factories*, 2010, 9, 65-) y se expresó en la cepa de *E. coli* BL21. Marcado con una cola de Histidina, el antígeno (SEQ ID NO: 7) se purificó mediante cromatografía de afinidad en columna His-IMAC (BIORAD). El fragmento de proteína permeasa recombinante purificado ([rPermeasa] = 1 mg/ml en Tris 25 mM, Arginina 0,5 M, Tampón de sacarosa al 5 %, pH 8) tenía una pureza del 82 %.

Péptido de ectodominio de gp41 de VIH (GP)

La preparación de péptido de ectodominio de VIH-gp41 recombinante (GP) se desvela en Krell *et al.*, *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271, 1566-1579. Brevemente, un fragmento de ADN de 0,6 kb que contenía la secuencia que codifica el ectodominio de gp41 de aislado de VIH LAI (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, correspondiente a los restos de aminoácidos 540 a 673 de gp160 (SEQ ID NO: 14)), se obtuvo mediante el uso de amplificación por PCR, como molde, un plásmido que contenía la secuencia de gp120 y la secuencia de gp41 del aislado LAI. El codón de inicio en el cebador directo es un resto de metionina de origen natural. Se añadieron un codón de parada y la secuencia de ADN que codificaba la extensión GGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 15) al cebador inverso. Se usó la polimerasa HF Platino (GIBCO INVITROGEN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para la amplificación por PCR. El fragmento amplificado por PCR se clonó directamente en el vector pM1800 usando los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*. El vector de expresión pM1800 es un derivado de pET28c (NOVAGEN), en el que el origen F1 de replicación se ha suprimido y reemplazado con el fragmento Cer, permitiendo una resolución de multímeros. Para la expresión de proteínas, se transformó *E. coli* BL21(DE3) con los plásmidos correspondientes. Marcado con una cola de histidina, el antígeno de ectodominio (SEQ ID NO: 16) se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna de quelación Hi-Trap de 5 ml (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). La elución de proteína se consiguió usando un tampón que comprendía Tris 50 mM/HCl, urea 8 M, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 8,0. El repliegamiento de la proteína se consiguió mediante diálisis con formiato 50 mM, Ph 2,8. A continuación, la proteína se esterilizó mediante filtración y se almacenó a -45 °C.

1.2 Inmunización

Se realizó una inmunización en ratones transgénicos HAMIGA (Patente EP 1 680 449), una cepa de ratón transgénico que produce IgA quiméricas humanas/murinas con regiones constantes de la cadena pesada de IgA humana y regiones constantes de la cadena ligera murina y regiones variables (de las cadenas pesadas y ligeras). Se sincronizaron los ciclos estrales de ratones transgénicos HAMIGA mediante tratamiento con Depoprovera (5 días antes de la primera inmunización, 8 días y 16 días después de la inmunización - 2 mg/ratón/inyección por vía subcutánea). Se inmunizaron ratones transgénicos HAMIGA (10 ratones por grupo) por vía intradérmica (Grupo ID en oreja) o intravaginal (Grupo VAG) dos veces con dos semanas de intervalo con la permeasa truncada recombinante de *M. genitalium* (PERM) en adyuvante poliI:C (10 µg/ratón/inyección, relación Poli:C 1:2,5 (25 µg/ratón/inyección, INVIVOGEN)). Para comparación, se inmunizaron diez ratones HAMIGA con polipéptido de ectodominio de gp41 por vía ID (GP/ID, 10 µg/ratón/inyección, en adyuvante poliI:C (10 µg/ratón/administración, relación PoliI:C 1:2,5 (25 µg/ratón/inyección, INVIVOGEN)) y por vía vaginal (GP/VAG, 10 µg/ratón/administración, en adyuvante poliI:C (10 µg/ratón/administración, relación PoliI:C 1:2,5 (25 µg/ratón/administración, INVIVOGEN)). Como control negativo, se inmunizaron cinco ratones HAMIGA con antígeno de Albúmina Sérica Bovina (BSA) por vía ID.

1.3 Recogida de lavados vaginales

5 Se lavaron las cavidades vaginales de ratones inmunizados cada día durante un ciclo estral completo (4 días), lavando suavemente la cavidad vaginal con 200 µl de medio fisiológico (NaCl al 0,9 %, URGO).

1.4 Titulación de la concentración de IgA sérica e IgA secretora mediante ELISA

10 Se titularon mediante ELISA la IgA sérica de ratones HAMIGA inmunizados (purificada mediante cromatografía de afinidad) y la IgA secretora preparada a partir de los lavados vaginales. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos (Maxisorp®, NUNC) con 1 µg/ml de anticuerpos de cabra anti-IgA humana (BECKMAN COULTER) en tampón PBS durante la noche a 4 °C. Las placas se saturaron con un tampón BSA al 2 %/PBS1X durante 30 minutos a 37 °C. La incubación de las muestras (IgA secretora, diluida 10 veces en BSA al 0,2 %/PBS o IgA sérica purificada, diluida 100 veces en BSA al 0,2 %/PBS) se realizó a 37 °C durante 2 h. El intervalo de referencia de IgA humana (de [hIgA de control] = 0,2 mg/ml a 1,56 ng/ml) se incubó siguiendo el mismo protocolo y se reveló mediante un anticuerpo policlonal anti-hIgA de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (BECKMAN COULTER; diluido 2000 veces en BSA al 0,2 %/BSA).

1.5 Preparación de IgA monoclonal

20 Para aislar la IgA monoclonal de ratones inmunizados contra la permeasa, se realizó la inmortalización de linfocitos de células B específicos, de acuerdo con el protocolo de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C. *European Journal of Immunology*, 1976, 6, 511-9). Brevemente, esplenocitos de ratones inmunizados contra la permeasa se fusionaron con células de mieloma de ratones (X63 Sp2/0) y se subclonaron en placas de 96 pocillos. Los sobrenadantes de los clones de hibridoma se recogieron después de tres semanas de cultivo y se sometieron a ensayo para determinar su actividad neutralizadora en un ensayo de inhibición de la infección por VIH *in vitro*. Cada clon se crioconservó en medios DMSO al 10 %/SVF al 20 %/DMEM en nitrógeno líquido.

1.6 Purificación de IgA

30 Las IgA se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Las formas monoméricas y poliméricas de IgA se separaron mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaño.

1.7 Análisis de especificidad de antígeno

35 El fragmento de permeasa/IgA específica de ectodominio de gp41 se evaluó mediante ELISA utilizando placas Maxisorp® de 96 pocillos (NUNC) recubiertas con 1 a 5 µg/ml de antígenos durante la noche a 4 °C. Los sobrenadantes en bruto, la IgA sin purificar de los lavados vaginales o la IgA sérica purificada (diluida en PBS/Gelatina al 0,2 %) se incubaron durante 2 horas a 37 °C. La unión de IgA específica se reveló con un anticuerpo de cabra anti-IgA humana conjugado con AP (diluido 1/2000, BECKMAN COULTER).

1.8 Preparación celular

45 Se recogieron muestras de sangre de donantes sanos anónimos (Etablissement Français du Sang, EFS). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica mediante sedimentación Ficoll-Hypaque de las capas leucoplaquetarias. Se activaron CMSP con fitohemaglutinina-A (PHA, 1 mg/ml, SIGMA) en medio RPMI-suero de ternera fetal (FCS) al 10 % complementado con antibióticos (Penicilina y Estreptomina, 100 Unidades/ml y 100 µg/ml, respectivamente) a la concentración de 10.10⁶ células/ml durante 30 minutos. A continuación, las células se cultivaron en medio RPMI-FCS al 10 % complementado con antibióticos a 2.10⁶ células/ml. Después de 3 días, las células se congelaron. Se descongelaron las CMSP de 5 donantes, se agruparon y se cultivaron durante un día antes usarse en el ensayo de neutralización.

50 La estirpe celular TZM-B1 se obtuvo a través del programa de reactivos de NIH. Se cultivaron células TZM-B1 en medio RPMI-FCS al 10 % complementado con antibióticos (Penicilina y Estreptomina, 100 Unidades/ml y 100 µg/ml, respectivamente).

1.9. Preparación de virus

60 Se amplificaron aislados primarios de VIH-1 en leucocitos de sangre humana, como se ha descrito anteriormente (Holl *et al.*, *Blood*, 2006, 107, 4466-4474). Se concentraron soluciones madre de virus recogidas en el momento de máxima producción de virus 70 veces con un punto de corte de 100 kDa con un filtro de polietersulfona (Centricon® Plus-70 Biomax Filter; MILLIPORE). Se obtuvieron aislados primarios de VIH-1 del Instituto Nacional de Control y Patrones Biológicos (NIBSC): Aislado de VIH-1_{SF162} (subtipo B, R5), Aislado de VIH-1_{QH0} (subtipo B, cepa R5, R5), VIH-1_{89,6} (subtipo B, X4R5), Virus VIH-1_{DU174} (subtipo C, R5), VIH-1_{92BR025} (subtipo C R5), VIH-1_{92UG024} (subtipo D, X4), VIH-1_{KON} (subtipo CRF02-AG, X4). VIH-1 BaL (subtipo B) fue proporcionado por S. Gartner, M. Popovic y R. Gallo (NIH).

Se produjeron pseudovirus VIH-_{ISF162} y VIH-1_{QHO} (SF162.LS y QH0692.42) mediante cotransfección de la estirpe celular 293T con estructura principal de EnvC3 y Envs de VIH-_{ISF162} y VIH-1_{QHO}, respectivamente.

1.10 Ensayos de neutralización

Se realizaron ensayos de neutralización en células CMSP y TZM-bl humanas, como se ha descrito anteriormente (Mascola *et al.*, *J. Virol.*, 2005, 79, 10103-10107), usando dos cepas de referencia patrón de clado B como virus de pseudotipos Env (SF162.LS y QH0692.42; Li *et al.*, *J. Virol.*, 2005, 79, 10108-10125). La dosis inhibitoria del 50 %, 70 %, 80 % o 90 % se definió como la concentración de la muestra que provocó una reducción del 50 %, 70 %, 80 % o 90 % en unidades de luminiscencia relativa (ULR; Li *et al.*, *J. Virol.*, 2005, 79, 10108-10125) en TZM-bl o el porcentaje de células infectadas en CMSP, respectivamente.

1.11 Inhibición mediada por Fc de la replicación del VIH en MDM

El ensayo de inhibición mediado por Fc se realizó en macrófagos derivados de monocitos (MDM). Los MDM se generaron mediante el cultivo de monocitos CD14+ con GM-CSF durante 5 días. La inhibición de la replicación de VIH-1 SF162 o HIV-1 BaL sin células en MDM se evaluó como se describió anteriormente por Holl *et al.* (*J. Virol.*, 2006, 80, 6177-6181; *J. Immunol.*, 2004, 173, 6274-6283). Brevemente, los anticuerpos y los virus se incubaron durante 1 h antes de la adición a MDM. La replicación del virus se midió después de 48 h mediante la tinción intracelular de p24 en los MDM mediante citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células infectadas en comparación con los macrófagos infectados de control sin anticuerpos.

2. Resultados

Un antígeno de permeasa truncada de *M. genitalium* (SEQ ID NO: 7, correspondiente a la secuencia de aminoácidos 431-875 de la secuencia de permeasas de *M. genitalium* SEQ ID NO: 1) se expresó en *E. coli* y se usó para inmunizar ratones transgénicos HAMIGA que expresaban IgA humana quimérica. Grupos de diez ratones HAMIGA recibieron dos administraciones de fragmento de permeasa en adyuvante Poly I-C por vía intradérmica (Grupo PERM/ID) y vaginal (Grupo PERM/VAG). Al mismo tiempo, se inmunizaron grupos de diez ratones HAMIGA con polipéptido de ectodominio gp41 (SEQ ID NO: 16) (Grupo GP/ID; Grupo GP/VAG). Como control negativo, se inmunizaron cinco ratones HAMIGA con antígeno BSA (Grupo BSA) por vía ID. Se analizaron IgA de lavados vaginales e IgA sérica purificada de ratones HAMIGA inmunizados y de control.

Para identificar la vía de inmunización y el antígeno capaz de inducir una respuesta inmunitaria neutralizadora, la actividad neutralizadora de la IgA sérica de cada ratón inmunizado se midió frente a la cepa de virus SF162, un aislado de nivel 1, en un ensayo de neutralización basado en CMSP (figura 1). Aunque todas las IgA séricas de los ratones inmunizados con PERM muestran la capacidad de reaccionar de forma cruzada con epítomos de gp41 de VIH en ELISA (figura 2), sólo ocho IgA séricas de ratones inmunizados con PERM/ID y cinco IgA séricas de ratones inmunizados con PERM/VAG pudieron presentar una potencia fuerte de neutralización de la infección por VIH-1 con una CI90 en un intervalo de 60 µg/ml (figura 1). A pesar de una fuerte unión anti-gp41 (figura 2), ninguna IgA sérica de los grupos de ratones inmunizados con GP/ID y GP/VAG fue capaz de alcanzar la actividad neutralizadora de la CI90 (figura 1). Como cabía esperar, en el grupo de ratones inmunizados con albúmina sérica bovina (BSA), las IgA séricas purificadas no mostraron ninguna unión a gp41 mediante ELISA ni actividad de neutralización de la infección por VIH-1 (figura 1).

Además, solamente los grupos de IgA vaginales del grupo inmunizado con PERM/ID y PERM/VAG (n = 10) presentaron una actividad de neutralización fuerte frente al VIH-1_{SF162} (un aislado de nivel 1), con la CI90 más baja (en un intervalo de 1,5 a 2,5 µg/ml; Tabla II). Los grupos de IgA vaginales del grupo inmunizado con PERM/VAG (n = 10) alcanzaron una CI50 < 2,5 µg/ml frente al aislado QHO (un aislado de nivel 2) cuando se realizó en un ensayo de inhibición de la infección basado en células TZM-bl.

Tabla II: Actividad neutralizadora específica de VIH-1 de grupos de IgA vaginales purificadas de ratones HAMIGA inmunizados

Células diana	CMSP		TZM	
	CI90		CI50	
Porcentaje de inhibición de la infección por VIH-1				
Virus VIH-1	SF162	QHO	SF162	QHO
Grupo de HAMIGA inmunizados (n = 10)				
IgA Vaginal GP/ID	0,010	>0,010	>0,01	>0,01
IgA vaginal GP/VAG	>0,016	>0,016	0,016	0,016
IgA vaginal PERM/ID	0,0015	>0,0015	>0,0015	>0,0015
IgA vaginal PERM/VAG	0,0025	>0,0025	0,002	0,0025
IgA vaginal preinmune	>0,0035	>0,0035	>0,0035	>0,0035
IgA vaginal BSA	0,0115	>0,0115	>0,0115	>0,0115

*Los títulos de inhibición de la infección por VIH se expresan en mg/ml

Los sobrenadantes de clones de hibridoma de ratones inmunizados con permeasa se sometieron a ensayo para determinar la actividad neutralizadora en un ensayo en CMSP frente al aislado VIH-1_{SF162}. De los 900 sobrenadantes de hibridoma, 141 mostraron un 80 % de neutralización de la infección vírica, incluyendo 34 que mostraron un 90 % de potencia de neutralización. Un clon, C3G4, se subclonó tres veces y las especificidades antipermeasa se confirmaron mediante ELISA. Se estabilizó un clon llamado C3-G4.EA5.IH2.JA11 finalmente. Los segmentos variables de la inmunoglobulina neutralizadora, una IgA_{1,κ} quimérica humana, se secuenciaron y analizaron en la base de datos IMGT (www.imgt.org/vquest).

Tabla III: Secuencia y análisis de los segmentos variables de la IgA_{1κ} monoclonal quimérica humana neutralizadora de VIH-1, C3G4

Cadena pesada			
	<i>IgH-V</i>	<i>IgH-D</i>	<i>IgH-J</i>
mab hlgA1 (clon de C3G4)	5-12-1*01F	1-1*01	2*01 F
Identidad del gen de estirpe germinal de ratón	93,06 %		82,98 %
Secuencia de AA de <i>IgHV</i>	EVQMVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFANFYDMSWVRQTPAK RLEWVAYISGGGGHTYYRDTLKGRTVSRDANKNTLYLQMNSLKS EDTAMYYCTRHGTSWDYWGQGT (SEQ ID NO: 8)		
Cadena ligera			
	<i>IgH-V</i>	<i>IgH-J</i>	
mab hlgA1 (clon de C3G4)	15-103*01	1*01 F	
Identidad del gen de estirpe germinal de ratón	95,34 %	94,74 %	
Secuencia de AA de <i>IgL</i>	DIQMNQSPSSLSASLGDTISITCRASQNFWSWYQLKPGNIPKQ LIYKTSNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDATYYCLQGQS YPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 9)		

El sobrenadante de C3G4 contiene una IgA1 monoclonal tanto monomérica como polimérica (Figura 3, línea 1). Se prepararon fracciones enriquecidas en formas monoméricas (Figura 3, línea 2) y poliméricas de IgA (Figura 3, línea 3) y se sometieron a ensayo su afinidad por la permeasa de *M. genitalium* (figura 4, A) y la reactividad cruzada con gp41 de VIH en ELISA (figura 4, B). En cada ensayo ELISA, la forma enriquecida en IgA polimérica de C3G4 presentó la mayor afinidad por la permeasa truncada de *M. genitalium* y el polipéptido de ectodominio de gp41.

Se sometieron a ensayo fracciones enriquecidas en IgA monomérica e IgA polimérica de C3G4 purificado principalmente en un ensayo de neutralización en CMSP con dos aislados de virus VIH-1, SF162 y QHO (figura 4C). La forma enriquecida en IgA polimérica inhibió fuertemente la infección por ambos aislados de VIH-1, SF162 (CI70 de 2 µg/ml) y QHO (CI70 de 23 µg/ml). Se consiguió una inhibición del 90 % de la infección por el aislado VIH-1_{SF162} con 126 µg/ml de C3G4 enriquecido en IgA polimérica. En cada ensayo, La forma polimérica de IgA de C3G4 mostró una mayor potencia neutralizadora que la forma enriquecida en IgA monomérica de C3G4.

También se sometieron a ensayo las formas monomérica y polimérica de C3G4 en un ensayo de neutralización basado en macrófagos. El ensayo muestra la actividad inhibitora mediada por Fc de los anticuerpos. Como se muestra en la Tabla IV, ambas formas presentaron una potencia de inhibición del 80% en ensayos basados en CMSP y macrófagos, en presencia de 6 µg/ml y 14 µg/ml de IgA de C3G4, respectivamente. Se consiguió el noventa por ciento de inhibición de la infección por VIH-1 cuando ambos ensayos se realizaron con 58 µg/ml de la forma polimérica de IgA de C3G4. La forma polimérica de IgA de C3G4 mostró una mayor potencia neutralizadora que la forma monomérica. La mayor avidez de la forma polimérica puede permitir al anticuerpo reconocer y capturar varias partículas víricas, a diferencia de la forma monomérica.

Tabla IV: Actividad neutralizadora específica de VIH-1 de fracciones enriquecidas monoméricas o poliméricas del anticuerpo IgA de C3G4

Tipo de célula humana		CMSP		Macrófagos	
Aislado de VIH-1		SF162		BaL	
Título de inhibición de la infección por VIH-1 (en mg/ml)		CI80	CI90	CI80	CI90
Muestras	C3G4-IgA1 purificada (que contiene dos formas mezcladas)	>0,125	>0,125	0,031	0,200
	C3G4 enriquecido en IgA1 monomérica	0,094	>0,094	0,023	0,094
	C3G4 enriquecido en IgA1 polimérica	0,006	0,058	0,014	0,058

La actividad neutralizadora de la IgA1 de C3G4 monoclonal también se sometió a ensayo en diferentes aislados primarios de VIH-1 (Figura 5). La IgA1 polimérica purificada presentó actividad de neutralización en nueve aislados primarios diferentes de VIH-1 a una CI50 y una CI80 bajas. C3G4 neutralizó aislados de VIH-1_{SF162}, VIH-1_{BR025} y VIH-

1_{TV1} con una gran potencia (CI80 comprendida en el intervalo de 2 a 20 µg/ml). C3G4 neutralizó VIH-1_{QHO, KON, 92UG024, 89.6} y _{RW} con potencia moderada (CI80 > 20 µg/ml).

5 Estos datos demuestran que el antígeno de permeasa de *Mycoplasma genitalium* representa un candidato de vacuna contra el VIH-1 capaz de sensibilizar una respuesta de la mucosa y sistémica de anticuerpos protectores ampliamente neutralizadores contra la infección por VIH en los individuos inmunizados.

Análisis

10 En este estudio, usando ratones HAMIGA para producir IgA, la inmunización con permeasa de *M. genitalium* adyuvada con polil:C administrada por las vías ID o vaginal indujo Ab IgA específicos capaces de reconocer el VIH-Gp41 y neutralizar aislados primarios de VIH-1.

15 IgA es el isotipo de anticuerpo más abundante que se produce semanalmente y se entrega mediante secreción en el área de la mucosa. Debido a que la infección por VIH se inicia generalmente en el sitio de la mucosa de entrada, los inventores presumieron que IgA imitaría mejor la respuesta en la mucosa, incluyendo la mucosa genital. El papel fundamental de la forma polimérica de IgA es evitar la entrada de patógenos mediante exclusión inmunitaria, pero también se presume que las IgA poliméricas aglutinan el virus y bloquean la transcitososis (Chomont, N. *et al. Virology*, 2008, 370, 246-254) y con mayor eficacia que su homólogo IgG (Hur, E. M. *et al. Blood*, 2012, 120, 4571-82).

20 La integridad del sistema inmunitario de la mucosa parece ser crítica para la tasa de progresión de la infección por VIH, porque está gravemente comprometida durante la infección aguda por VIH. Además del agotamiento masivo de linfocitos T CD4+, la frecuencia de células B productoras de IgA en el área de la mucosa disminuye drásticamente, disminuyendo las concentraciones de IgA secretoras lumbinales implicadas en la vía protectora de exclusión inmunitaria de patógenos (descrita tanto en la infección por VIH como por VIS); Alam *et al., J. Virol.*, 2008, 82, 115-125; Muro-Cacho *et al., J. Immunol.*, 1995, 154, 5555-5566; Douek *et al.*, 2006, *Nat. Immunol.*, 2006, 7, 235-239).

30 Se usaron ratones transgénicos que expresaban IgA quimérica humana (patente EP 1 680 449) para garantizar la selección de un anticuerpo monoclonal de clase IgA, puesto que una inmunización convencional de ratones de tipo silvestre por lo general conduce a una respuesta específica de IgG. Esta estirpe de ratón se modificó para expresar una cadena pesada de IgA humana constante, mientras que los genes de la cadena ligera constante y variables seguían siendo del origen murino. El anticuerpo neutralizador de C3G4 se indujo mediante inmunización activa en la que el repertorio murino y no humano se ha implicado en el reconocimiento del antígeno. La posibilidad de generar la misma respuesta en seres humanos solamente puede evaluarse en ensayos clínicos.

35 La resistencia a la infección por VIH es un fenómeno poco frecuente. Aunque pueden contribuir varios mecanismos, incluyendo factores genéticos (mutación d32 de CCR5, alotipo MHC...) o factores inmunitarios tales como la IgA específica en secreciones vaginales dirigidas contra el gp41 de VIH-1, pueden estar implicados otros factores.

40 La respuesta de Ab humanos y murinos frente a muchos patógenos comunes es oligoclonal, con un uso restringido de los genes Ig V (Bos, N. A. *et al., Infection and Immunity*, 1996, 64, 616-623; Baxendale, H. E. y Goldblatt, D., *Infection and Immunity* 2006, 74, 1025-1031). Además, en la mucosa expuesta a una multitud de gérmenes, estos Ab son polirreactivos y establecen una homeostasis inmunitaria natural (Shimoda *et al., Immunology*, 1999, 97, 9-17).

45 Por tanto, los inventores proponen que la respuesta innata a la microbiota del tracto genital (comensal o patógena) también podría desempeñar un papel contra la infección por VIH (u otros patógenos). La característica innata de la respuesta es sugerida por el perfil oligoclonal de IgA encontrado en MNIAE y la característica germinal del Ab. El aislamiento de un Ab contra *M. genitalium* reactivo de forma cruzada con gp41 y que neutraliza VIH-1 proporciona pruebas adicionales. Aunque el pensamiento actual es que la vacuna debe inducir Ab hipermutados con el fin de neutralizar el VIH-1 (Klein, F. *et al., Cell*, 2013, 153, 126-38), los inventores proponen que en el sitio de la mucosa, portal principal de entrada del virus, los Ab no madurados por afinidad inducidos por comensales o patógenos específicos, podrían neutralizar y proteger contra la infección por VIH. Las MNIAE pueden tener una flora particular única con una respuesta inmunitaria nativa que contribuye a la resistencia a la infección por VIH-1. La comparación de la microbiota en MNIAE y mujeres que se infectan más tarde ayudará a aclarar esta suposición.

55 La clave para una estrategia de vacunación eficaz parece ser la identificación del antígeno sensibilizador que induce la selección y proliferación del linaje B progenitor para una futura maduración a lo largo de su historia inmunitaria. Para algunas infecciones víricas, el antígeno que activa inicialmente determinados linajes de células B vírgenes y que estimula las células B de memoria puede no ser idéntico.

60 Los inventores proponen que esta población de precursores B vírgenes puede reclutarse y sensibilizarse por antígenos, no solo de infecciones pasadas sino de la actual colonización natural de microorganismos comensales. La inmunización mediante antígenos de *Mycoplasma genitalium* indujo anticuerpos anti-VIH reactivos de forma cruzada e indujo una respuesta anti-VIH ampliamente neutralizadora sistémica y de la mucosa. El segmento variable IgH de uno de los anticuerpos monoclonales neutralizadores del presente estudio desvela una homología mayor con el progenitor de la estirpe germinal murina IgVH5-12 (Figura 6). De forma interesante, este segmento murino particular

muestra una fuerte identidad con la IgVH1-2*2 sin mutar humana, progenitor de VRC01 anticuerpo monoclonal ampliamente neutralizador del VIH (bNab). La comparación de las regiones IgVH pone de relieve una secuencia conservada que abarca 50 de los 98 restos de aminoácidos, incluyendo cinco restos canónicos de contacto con el VIH y, en particular, eArg⁷¹_{C3G4-VRC01}, que imita la interacción clave de Arg⁵⁹_{CD4} y Asp³⁶⁸_{gp120} (Scheid, J. F. *et al.*, *Science*, 2011, 333, 1633-1637). Incluso si no se conservan todos los restos críticos, la comparación de IgVH5-12 con la IgVH1-2*2 humana (S18 y S19, Jardine y Schief, *Science*, mayo de 2013, vol. 340) sugirió que la arquitectura conformacional estrecha de los dos progenitores podría ser el punto clave de su capacidad para neutralizar adicionalmente la infección por VIH-1, dirigiéndose hlgVH1-2*2 al gp120 mientras que mlgVH5-12 se dirige al gp41 en la superficie de partículas víricas del VIH-1.

Los inventores proponen la permeasa de *M. genitalium* como un candidato prometedor para iniciar un protocolo de vacuna principalmente a nivel de la mucosa basándose en su capacidad para sensibilizar clones de células B vírgenes, capaces de reconocer adicionalmente antígenos de VIH nativos.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DISEÑO DE CÉLULAS B

20 <120> UN NUEVO ANTÍGENO DE VACUNA NO DE VIH DE LA MICROBIOTA VAGINAL CAPAZ DE INDUCIR UNA RESPUESTA DE ANTICUERPOS PROTECTORES NEUTRALIZADORES DE LA MUCOSA CONTRA LA INFECCIÓN POR VIH

<130> 2498PCT2

25 <160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 1783

<212> PRT

<213> *Mycoplasma genitalium*

35 <400> 1

ES 2 809 512 T3

Met Phe Ser Phe Phe Lys Gln Ile Phe Lys Ser Leu Lys Lys Phe Phe
 1 5 10 15

Phe Leu Leu Phe Gly Ile Ile Phe Val Leu Phe Ser Ile Ile Phe Leu
 20 25 30

Glu Thr Ser Ile Val Gln Leu Ser Asn Asn Leu Val Ser Thr Tyr Thr
 35 40 45

Thr Leu Val Ser Lys Thr Asn Ser Ser Asp Ile Val Ala Pro Ala Ile
 50 55 60

Leu Lys Glu Ala Asn Pro Val Tyr Ile Ala Ser Leu Thr Asn Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Tyr Phe Ser Lys Ile Lys Ile Asp Asp Lys Lys Ile Asn Tyr Leu
 85 90 95

Phe Pro Tyr Gln Glu Asn Asp Phe Gly Ser Asp Ser Gly Gln Ser Asn
 100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asn Gln Asn Lys Thr Ile Pro Arg Lys Gly Asp Val
 115 120 125

Asn Glu Lys Asp Lys Leu Phe Leu Ala Arg Lys Arg Gly Ile Leu Lys
 130 135 140

Ala Tyr Gly Glu Ala Asn Ile Ala Glu Lys Arg Ile Tyr Lys Gly Leu
 145 150 155 160

Ala Val Ser Phe Asn Asn Thr Asp Ser Phe Asn Gly Ser Asp Ile Ser
 165 170 175

ES 2 809 512 T3

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

ES 2 809 512 T3

Phe Asn Asn Leu Lys Glu Glu Asp Lys Arg Lys Ala Ala Asn Asn Tyr
 675 680 685
 Leu Ala Leu Leu Ser Tyr Phe Thr Pro Ala Phe Gln Asp Pro Asn Glu
 690 695 700
 Leu Ile Glu Thr Asn Arg Gln Met Leu Glu Ile Pro Ile Thr Val Lys
 705 710 715 720
 Asn Gly Val Asn Pro Leu Ile Leu Pro Thr Asp Gln Gln Asn Leu Val
 725 730 735
 Val Gln Thr Pro Glu Ala His Gly Ala Val Val Ser Gln Gln Trp Leu
 740 745 750
 Phe Arg His Asn Lys Glu Ile Leu Pro Gln Glu Gly Glu Tyr Ala Trp
 755 760 765
 Lys Thr Ala Leu Gln Thr Pro Asn Asn Phe Pro Asn Trp Leu Asn Asp
 770 775 780
 Leu Pro Asp Arg Tyr Lys Phe Ser Ile Asn Gly Leu Thr Phe Ala Ile
 785 790 795 800
 Leu Gly Ile Gly Glu Ser Val Glu Thr Gly Tyr Pro Val Leu Ser Leu
 805 810 815
 Gln Ser Pro Leu Pro Asn Thr Gln Asp Glu Ala Leu Ile Phe Val Asn
 820 825 830
 Asp Gln Ala Tyr Arg Ser Ile Leu Phe Ala Val Pro Ala Ala Asn Gln
 835 840 845
 Glu Asn Tyr Tyr Ala Phe Lys Ser Thr Asp Leu Lys Gln His Thr Asp
 850 855 860
 Gln Asp Pro Val Gln Phe Ile Ala Asn Arg Leu Glu Gly Tyr Leu Asp
 865 870 875 880
 Val Pro Arg Ser Asp Leu Ala Phe Asn Val Lys Asp Ile Ser Lys Phe
 885 890 895
 Asn Tyr Leu Thr Thr Ala Arg Asn Tyr Phe Pro Asp Leu Val Gln Ser
 900 905 910
 Tyr Leu Ala Ile Val Ser Thr Val Ile Ala Ile Phe Leu Ile Ile Leu
 915 920 925

ES 2 809 512 T3

Ala Leu Tyr Leu Ile Ile Leu Leu Ile Lys Ser Phe Ile Lys Lys Asn
930 935 940

Gln Thr Glu Phe Ser Ile Ile Arg Ala Gly Gly Phe Ser Thr Thr Lys
945 950 955 960

Phe Ile Val Gly Met Ser Val Phe Ala Gly Ile Val Ala Ile Val Ser
965 970 975

Ser Phe Leu Gly Val Leu Phe Ala Phe Leu Leu Glu Gly Gln Val Lys
980 985 990

Gly Ile Ile Asn Arg Tyr Trp Phe Ile Ala Leu Pro Glu Asn Ser Phe
995 1000 1005

Asn Trp Leu Ser Phe Phe Gly Ser Phe Phe Ile Thr Phe Phe Val
1010 1015 1020

Phe Glu Phe Ile Ser Trp Ile Ala Phe Lys Gln Leu Phe Ser Lys
1025 1030 1035

Pro Val Asn Val Leu Ile Asp Gln Gly Asn Glu Thr Lys Phe Ser
1040 1045 1050

Val Leu Leu His Leu Leu Lys His Lys Ser His Thr Met Ser Pro
1055 1060 1065

Leu Thr Lys Phe Arg Val Ser Leu Ile Val Ser Arg Phe Ser Arg
1070 1075 1080

Leu Phe Thr Tyr Val Gly Leu Ser Ser Val Ala Leu Leu Leu Ile
1085 1090 1095

Gly Ile Ala Gly Thr Ile Pro Gln Lys Phe Ser Ala Ala Gln Thr
1100 1105 1110

Ser Thr Ser Leu Asn Arg Asn Phe Asn Tyr Lys Leu Asn Leu Gln
1115 1120 1125

Thr Pro Thr Glu Gln Ser Gly Trp Tyr Ala Ile Gln Pro Tyr Ser
1130 1135 1140

His Phe Gly Val Thr Asp Asn Asn Asn Gly Ile Lys Thr Leu Tyr
1145 1150 1155

Asn Glu Ser Val Gln Ala Asn Ser Gln Asn Glu His Pro Tyr Lys
1160 1165 1170

ES 2 809 512 T3

Pro Ser Asn Leu Lys Leu Lys Asn Arg Gln Asp Gln Pro Ile Lys
 1175 1180 1185

Ala Ala Asp Gly Thr Glu Leu Glu Leu Gly Asn Leu Leu Leu Pro
 1190 1195 1200

Ser Tyr Gly Gly Ala Gln Gln Leu Asn Thr Asp Glu Asn Phe Phe
 1205 1210 1215

Arg His Ala Ser Leu Ser Lys Trp Ile Ile Asp Phe Pro Ile Arg
 1220 1225 1230

Val Gly Gly Ser Asn Ile Asn Pro Trp Glu Ile Val Glu Lys Ser
 1235 1240 1245

Ile Pro Lys Gln Ile Thr Gln Leu Leu Ser Ala Ser Ser Asp Gln
 1250 1255 1260

Phe Leu Ile Ser Val Leu Thr Asp Asp Phe Phe Asn Asn Leu Asn
 1265 1270 1275

Ala Asn Gly Phe Leu Ile Arg Asn Pro Arg Thr Asn Gln Ile Gln
 1280 1285 1290

Leu Asp Ala Ser Arg Val Leu Thr Thr Ile Asp Val Phe Asn Pro
 1295 1300 1305

Gly Gly Val Lys Phe Asn Asp Ser Phe Leu Ser Phe Met Leu Lys
 1310 1315 1320

Val Tyr Gly Asp Phe Glu Leu Ala Lys Gln Asp Ser Lys Leu Asn
 1325 1330 1335

Phe Gly Ile Val Pro Val Asp Pro Ala Ile Glu Glu Thr Tyr Thr
 1340 1345 1350

Tyr Val Glu Gly Pro Phe Gly Phe Gln Glu Asp Asn Leu Asp Glu
 1355 1360 1365

Asn Ser Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Ile Asn Pro Glu Ser Ser Phe
 1370 1375 1380

Val Asn Leu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Ser Leu Arg Asn Leu Ile
 1385 1390 1395

Ser Ser Asp Gln Glu Met Asn Val Ile Val Asn Ala Gly Phe Gln

ES 2 809 512 T3

1400						1405						1410			
Tyr	Ala	Asn	Asn	Ile	Asn	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Tyr	Ile	Lys	Pro	
1415						1420					1425				
Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Arg	Tyr	Ser	Glu	Lys	Phe	Leu	Lys	Ala	Pro	
1430						1435					1440				
Leu	Asn	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Phe	Lys	Val	Val	Gly	Val	Ser	Thr	
1445						1450					1455				
Asp	Ala	Phe	Gly	Gln	Glu	Leu	Tyr	Ile	Asn	Gln	His	Ile	Ala	Asn	
1460						1465					1470				
Asn	Leu	Leu	Lys	Leu	Ser	Gly	Asn	Gln	Gly	Arg	Gly	Ile	Ile	Arg	
1475						1480					1485				
Asp	Val	Ile	Lys	Lys	Thr	Asn	Gly	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Glu	
1490						1495					1500				
Tyr	Glu	Ile	Asp	Tyr	Val	Lys	Pro	Asn	Gly	Tyr	Val	Pro	Phe	Asn	
1505						1510					1515				
Gly	Val	Phe	Ser	Lys	Glu	Leu	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	Asn	Lys	Ala	
1520						1525					1530				
Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Ile	Ile	Gly	Val	Trp	Gly	Asn	Phe	Thr	Asp	
1535						1540					1545				
Phe	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Val	Arg	Asn	Lys	Leu	Asp	Lys	
1550						1555					1560				
Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Pro	Thr	Asp	Pro	Glu	Ile	Ile	Asn	Lys	
1565						1570					1575				
Leu	Ala	Gln	Glu	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Thr	Thr	Ser	Met	Asn	Tyr	
1580						1585					1590				
Glu	Ser	Leu	Arg	Lys	Glu	Leu	Val	Asn	Lys	Tyr	Lys	Thr	Glu	Trp	
1595						1600					1605				
Asn	Ser	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	
1610						1615					1620				
Asn	Asn	Ile	Ile	Ala	Pro	Val	Leu	Asn	Ile	Asp	Ala	Ala	Gly	Thr	
1625						1630					1635				

ES 2 809 512 T3

Ser Ala Gln Ile Ile Arg Asn Asn Ala Glu Val Leu Phe Asn Thr
 1640 1645 1650

Val Asn Gln Val Asp Ala Phe Leu Leu Gly Thr Ile Ile Pro Phe
 1655 1660 1665

Ile Phe Ile Thr Cys Val Val Leu Gly Ile Ser Met Leu Glu Glu
 1670 1675 1680

Met Lys Arg Ile Phe Ile Ser Leu Lys Ala Ile Gly Tyr Arg Asp
 1685 1690 1695

Val Gln Asn Leu Ile Ser Leu Leu Thr Phe Phe Ile Pro Ala Phe
 1700 1705 1710

Val Leu Ala Leu Leu Ile Ser Ile Gly Val Leu Ala Gly Val Leu
 1715 1720 1725

Ile Gly Ile Gln Ala Val Val Phe Asn Val Ala Gln Val Phe Leu
 1730 1735 1740

Thr Asn Val Phe Glu Phe Leu Pro Tyr Met Val Gly Ile Val Leu
 1745 1750 1755

Phe Gly Val Thr Ile Phe Val Ile Gly Ser Tyr Phe Trp Ile Lys
 1760 1765 1770

Leu Arg Ser Ala Glu Leu Lys Glu Gly Phe
 1775 1780

- <210> 2
- 5 <211> 134
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 2

ES 2 809 512 T3

Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
1 5 10 15

Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
20 25 30

Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala
35 40 45

Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
50 55 60

Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp
65 70 75 80

Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
85 90 95

Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile
100 105 110

Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
115 120 125

Leu Asp Lys Trp Ala Ser
130

5 <210> 3
<211> 36
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético
<400> 3

Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile Val Asn Arg
1 5 10 15

Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu Pro Thr
20 25 30

Pro Arg Gly Pro
35

15 <210> 4
<211> 445
<212> PRT
<213> secuencia artificial

ES 2 809 512 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <400> 4

Met Val Arg Asn Asn Asn Leu Ser Phe Gln Pro Ser Ser Asn Asn Leu
1 5 10 15

Gln Leu Val Gln Asn Gln Asn Ser Gln Ala Ser Asn Gly Ile Ala Asp
20 25 30

ES 2 809 512 T3

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

ES 2 809 512 T3

Val Lys Asn Gly Val Asn Pro Leu Ile Leu Pro Thr Asp Gln Gln Asn
 290 295 300

Leu Val Val Gln Thr Pro Glu Ala His Gly Ala Val Val Ser Gln Gln
 305 310 315 320

Trp Leu Phe Arg His Asn Lys Glu Ile Leu Pro Gln Glu Gly Glu Tyr
 325 330 335

Ala Trp Lys Thr Ala Leu Gln Thr Pro Asn Asn Phe Pro Asn Trp Leu
 340 345 350

Asn Asp Leu Pro Asp Arg Tyr Lys Phe Ser Ile Asn Gly Leu Thr Phe
 355 360 365

Ala Ile Leu Gly Ile Gly Glu Ser Val Glu Thr Gly Tyr Pro Val Leu
 370 375 380

Ser Leu Gln Ser Pro Leu Pro Asn Thr Gln Asp Glu Ala Leu Ile Phe
 385 390 395 400

Val Asn Asp Gln Ala Tyr Arg Ser Ile Leu Phe Ala Val Pro Ala Ala
 405 410 415

Asn Gln Glu Asn Tyr Tyr Ala Phe Lys Ser Thr Asp Leu Lys Gln His
 420 425 430

Thr Asp Gln Asp Pro Val Gln Phe Ile Ala Asn Arg Leu
 435 440 445

- <210> 5
- 5 <211> 1338
- <212> DNA
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polinucleótido sintético
- <400> 5

ES 2 809 512 T3

atggtgcgca ataataatct gagctttcag ccgagcagca ataatctgca gctggtgag	60
aatcagaata gccaggcaag caatggtatt gcagatccga attttagcaa tgttcagacc	120
gcctataata aaattcatca gagcaataat acaccgaaa aaaccctgga tgcagtttat	180
gcagcagttc tggatcagtg gcgtagcatt tttcaggaag atctggttaa aaaaaccgtg	240
gatctgctgg aaaaatatcg cgatcatttt ctgaaagcca ccgcctttaa taatattgat	300
tatagcaaac agaattattgc cattgccaat aatggttagca gcgcagaaa cgcaagcttt	360
ctggtgagca ataaagatga acagcgctat aatgatctga gcctgattga tgggtgtgat	420
ctgaaaagct ggctgtttaa accggaacag aatgaaagca atccgctgga taccatttat	480
ggtggtcagg atgccaataa tggctttctg cagaaaattg attatgaatt taaaccgagc	540
accagcagcg gtggtatgac cgcaagcctg aaaaataccc aggcactgag cccgaaaagc	600
accaaatttc cgatttatcc gaaactggcc aatattattg cacaggcaca gctgccggaa	660
gcaaccaata ttccgaccac cgactggat gactgaaac agtggaccaa tctggatgcc	720
aatggcttta ataactgaa agaagaagat aaacgcaaag cagccaataa ttatctggca	780
ctgctgagct attttacacc ggcatttcag gatccgaatg aactgattga aaccaatcgt	840
cagatgctgg aaattccgat taccgtgaaa aatggtgtga atccgctgat cctgccgacc	900
gatcagcaga atctggttgt tcagacaccg gaagcacatg gtgcagttgt tagccagcag	960
tggctgtttc gtcataataa agaaattctg ccgcaggaag gtgaatatgc atggaaaacc	1020
gcactgcaga ccccgataa tttccgaat tggctgaatg atctgccgga tcgctataaa	1080
tttagcatta atggcctgac ctttgcaatt ctgggtattg gtgaaagcgt tgaaaccggt	1140
tatccggttc tgagcctgca gtctccgctg ccgaataccc aggatgaagc cctgattttt	1200
gttaatgatc aggcctatcg cagcattctg tttgcagttc cggcagcaaa tcaggaaaat	1260
tattacgcct ttaaagcac cgatctgaaa cagcataccg atcaggatcc ggttcagttt	1320
attgcaaatc gcctgtaa	1338

<210> 6
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

10

<400> 6

ES 2 809 512 T3

atggtgcgca ataataatct gagctttcag ccgagcagca ataatctgca gctggtgcag 60
aatcagaata gccaggcaag caatggtatt gcagatccga attttagcaa tgttcagacc 120
gcctataata aaattcatca gagcaataat acaccggaaa aaaccctgga tgcagtttat 180
gcagcagttc tggatcagtg gcgtagcatt tttcaggaag atctggttaa aaaaaccgtg 240
gatctgctgg aaaaatatcg cgatcatttt ctgaaagcca cgcctttaa taatattgat 300
tatagcaaac agaattattgc cattgccaat aatggttagca gcgcagaaaag cgcaagcttt 360
ctggtgagca ataaagatga acagcgctat aatgatctga gcctgattga tgggtttgat 420
ctgaaaagct ggctgtttaa accggaacag aatgaaagca atccgctgga taccatttat 480
ggtggtcagg atgccaataa tggctttctg cagaaaattg attatgaatt taaaccgagc 540
accagcagcg gtggtatgac cgcaagcctg aaaaataccc aggcactgag cccgaaaagc 600
accaaatttc cgatttatcc gaaactggcc aatattattg cacaggcaca gctgccggaa 660
gcaaccaata ttccgaccac cgcaactggat gcaactgaaac agtggaccaa tctggatgcc 720
aatggcttta ataatctgaa agaagaagat aaacgcaaag cagccaataa ttatctggca 780
ctgctgagct attttacacc ggcatttcag gatccgaatg aactgattga aaccaatcgt 840
cagatgctgg aaattccgat taccgtgaaa aatggtgtga atccgctgat cctgccgacc 900
gatcagcaga atctggttgt tcagacaccg gaagcacatg gtgcagttgt tagccagcag 960
tggctgtttc gtcataataa agaaattctg cgcaggaag gtgaatatgc atggaaaacc 1020
gcactgcaga ccccgaataa ttttccgaat tggctgaatg atctgccgga tcgctataaa 1080
tttagcatta atggcctgac ctttgcaatt ctgggtattg gtgaaagcgt tgaaacccgtt 1140
tatccggttc tgagcctgca gtctccgctg ccgaataccc aggatgaagc cctgattttt 1200
gttaatgatc aggcctatcg cagcattctg tttgcagttc cggcagcaaa tcaggaaaat 1260
tattacgcct ttaaaagcac cgatctgaaa cagcataccg atcaggatcc ggttcagttt 1320
attgcaaate gcctgcatca ccatcaccat cattaataa 1359

<210> 7
<211> 451
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> Polipéptido sintético

<400> 7

ES 2 809 512 T3

Met Val Arg Asn Asn Asn Leu Ser Phe Gln Pro Ser Ser Asn Asn Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Val Gln Asn Gln Asn Ser Gln Ala Ser Asn Gly Ile Ala Asp
 20 25 30

Pro Asn Phe Ser Asn Val Gln Thr Ala Tyr Asn Lys Ile His Gln Ser
 35 40 45

Asn Asn Thr Pro Glu Lys Thr Leu Asp Ala Val Tyr Ala Ala Val Leu
 50 55 60

Asp Gln Trp Arg Ser Ile Phe Gln Glu Asp Leu Val Lys Lys Thr Val
 65 70 75 80

Asp Leu Leu Glu Lys Tyr Arg Asp His Phe Leu Lys Ala Thr Ala Phe
 85 90 95

Asn Asn Ile Asp Tyr Ser Lys Gln Asn Ile Ala Ile Ala Asn Asn Val
 100 105 110

ES 2 809 512 T3

Ser Ser Ala Glu Ser Ala Ser Phe Leu Val Ser Asn Lys Asp Glu Gln
115 120 125

Arg Tyr Asn Asp Leu Ser Leu Ile Asp Gly Val Asp Leu Lys Ser Trp
130 135 140

Leu Phe Lys Pro Glu Gln Asn Glu Ser Asn Pro Leu Asp Thr Ile Tyr
145 150 155 160

Gly Gly Gln Asp Ala Asn Asn Gly Phe Leu Gln Lys Ile Asp Tyr Glu
165 170 175

Phe Lys Pro Ser Thr Ser Ser Gly Gly Met Thr Ala Ser Leu Lys Asn
180 185 190

Thr Gln Ala Leu Ser Pro Lys Ser Thr Lys Phe Pro Ile Tyr Pro Lys
195 200 205

Leu Ala Asn Ile Ile Ala Gln Ala Gln Leu Pro Glu Ala Thr Asn Ile
210 215 220

Pro Thr Thr Ala Leu Asp Ala Leu Lys Gln Trp Thr Asn Leu Asp Ala
225 230 235 240

Asn Gly Phe Asn Asn Leu Lys Glu Glu Asp Lys Arg Lys Ala Ala Asn
245 250 255

Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Ser Tyr Phe Thr Pro Ala Phe Gln Asp Pro
260 265 270

Asn Glu Leu Ile Glu Thr Asn Arg Gln Met Leu Glu Ile Pro Ile Thr
275 280 285

Val Lys Asn Gly Val Asn Pro Leu Ile Leu Pro Thr Asp Gln Gln Asn
290 295 300

Leu Val Val Gln Thr Pro Glu Ala His Gly Ala Val Val Ser Gln Gln
305 310 315 320

Trp Leu Phe Arg His Asn Lys Glu Ile Leu Pro Gln Glu Gly Glu Tyr
325 330 335

Ala Trp Lys Thr Ala Leu Gln Thr Pro Asn Asn Phe Pro Asn Trp Leu
340 345 350

Asn Asp Leu Pro Asp Arg Tyr Lys Phe Ser Ile Asn Gly Leu Thr Phe

ES 2 809 512 T3

355		360		365											
Ala	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Glu	Ser	Val	Glu	Thr	Gly	Tyr	Pro	Val	Leu
370						375					380				
Ser	Leu	Gln	Ser	Pro	Leu	Pro	Asn	Thr	Gln	Asp	Glu	Ala	Leu	Ile	Phe
385					390					395					400
Val	Asn	Asp	Gln	Ala	Tyr	Arg	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Val	Pro	Ala	Ala
				405					410					415	
Asn	Gln	Glu	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Phe	Lys	Ser	Thr	Asp	Leu	Lys	Gln	His
			420					425					430		
Thr	Asp	Gln	Asp	Pro	Val	Gln	Phe	Ile	Ala	Asn	Arg	Leu	His	His	His
		435					440					445			
His	His	His													
		450													

<210> 8
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 8

ES 2 809 512 T3

Glu Val Gln Met Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Lys Tyr
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Arg Asp Thr Leu
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg His Gly Thr Ser Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 9

5

10

ES 2 809 512 T3

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Phe Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Gln Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Thr Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 10

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr
 1 5 10 15

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
 20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Asn Lys Ser Gly Gln Gly Val
 35 40 45

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr

5

10

ES 2 809 512 T3

50						55										60
Thr	Thr	Ser	Ser	Gln	Leu	Thr	Leu	Pro	Ala	Thr	Gln	Cys	Leu	Ala	Gly	
65					70					75					80	
Lys	Ser	Val	Thr	Cys	His	Val	Lys	His	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ser	Gln	Asp	
				85					90					95		
Val	Thr	Val	Pro	Cys	Pro	Val	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	
			100					105					110			
Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Ser	Cys	Cys	His	Pro	Arg	Leu	Ser	
		115					120					125				
Leu	His	Arg	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Asn	
	130					135					140					
Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Arg	Asp	Ala	Ser	Gly	Val	Thr	Phe	
145					150					155					160	
Thr	Trp	Thr	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	Asp	
				165					170						175	
Arg	Asp	Leu	Cys	Gly	Cys	Tyr	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Leu	Ser	Gly	Cys	
			180					185					190			
Ala	Glu	Pro	Trp	Asn	His	Gly	Lys	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr	Ala	Ala	Tyr	
		195					200					205				
Pro	Glu	Ser	Lys	Thr	Pro	Leu	Thr	Ala	Thr	Leu	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	
	210					215						220				
Thr	Phe	Arg	Pro	Glu	Val	His	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Ser	Glu	Glu	Leu	
225					230					235					240	
Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Ala	Arg	Gly	Phe	Ser	
				245					250					255		
Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Leu	Gln	Gly	Ser	Gln	Glu	Leu	Pro	
			260					265					270			
Arg	Glu	Lys	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala	Ser	Arg	Gln	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	
		275					280					285				
Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	
	290					295					300					

ES 2 809 512 T3

Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro
 325 330 335

Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys
 340 345 350

Tyr

5 <210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 11

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

15 <210> 12
 <211> 415
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polinucleótido sintético

25 <400> 12

ES 2 809 512 T3

actagaattc atgaactttg ggctcagctt ggttttcctt gtccttactt taaaagggtgt 60
 gaagtgtgaa gtccagatgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtcctt 120
 gaaactctcc tgtgcagcct ctggattcgc tttcaacaaa tatgacatgt cttgggttcg 180
 ccagactccg gcgaagaggg tggagtgggt cgcatacatt agtggtggtg gtggtcatac 240
 ttactatcga gacactttga agggccgctt caccgtctcc agagacaatg ccaagaacac 300
 cctataccta caaatgaaca gtctgaagtc tgaagacaca gccatgtatt actgtacaag 360
 acacggtact agctgggact actggggcca aggcaccgct ctactgtct cctca 415

5 <210> 13
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 13

actatgtaca atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgttct gctttttagg 60
 tgtgagatgt gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat ccctcggaga 120
 cacaatttcc atcacttgcc gtgccagtc gaacattaat ttttggttga gctggtacca 180
 gctgaaacca ggaaatattc ctaaacaatt gatctataag acttccaact tgcacacagg 240
 cgtcccatca aggttttagtg gcagtggtgc tggaaacagat ttcacattaa ccatcagcag 300
 tctgcagcct gaagacattg ccacttacta ctgtctccag ggtcagagtt atccgtggac 360
 gttcgggtggg ggcaccaaac tggaaatcaa acgg 394

15 <210> 14
 <211> 861
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

20 <400> 14

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

ES 2 809 512 T3

Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala His Cys
 325 330 335

Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Ala Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser
 340 345 350

Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln
 355 360 365

Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly
 370 375 380

Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp
 385 390 395 400

Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr Glu Gly Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser
 405 410 415

Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp
 420 425 430

Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile
 435 440 445

Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly
 450 455 460

Asn Asn Asn Asn Gly Ser Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met
 465 470 475 480

Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
 485 490 495

Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln
 500 505 510

Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu
 515 520 525

Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Arg Ser Met Thr Leu Thr Val
 530 535 540

Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu
 545 550 555 560

Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp
 565 570 575

ES 2 809 512 T3

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
580 585 590

Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
595 600 605

Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
610 615 620

Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
645 650 655

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala
660 665 670

Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
675 680 685

Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe
690 695 700

Ala Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu
705 710 715 720

Ser Phe Gln Thr His Leu Pro Thr Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu
725 730 735

Gly Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg
740 745 750

Leu Val Asn Gly Ser Leu Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu
755 760 765

Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr
770 775 780

Arg Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr
785 790 795 800

Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala
805 810 815

Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp
820 825 830

ES 2 809 512 T3

Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile
 835 840 845

Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
 850 855 860

5 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His
 1 5 10

15 <210> 16
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 16

Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
 1 5 10 15

Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
 20 25 30

Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala
 35 40 45

Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
 50 55 60

Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
 85 90 95

Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile
 100 105 110

Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu

ES 2 809 512 T3

115

120

125

Leu Asp Lys Trp Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His
 130 135 140

5 <210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Cys
 20 25 30

Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly
 100 105 110

15 <210> 18
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 18

25 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

ES 2 809 512 T3

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 19
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 19

Glu Val Gln Met Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Lys Tyr
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Arg Asp Thr Leu
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg His Gly Thr Ser Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ala Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 121

ES 2 809 512 T3

<212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 20

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

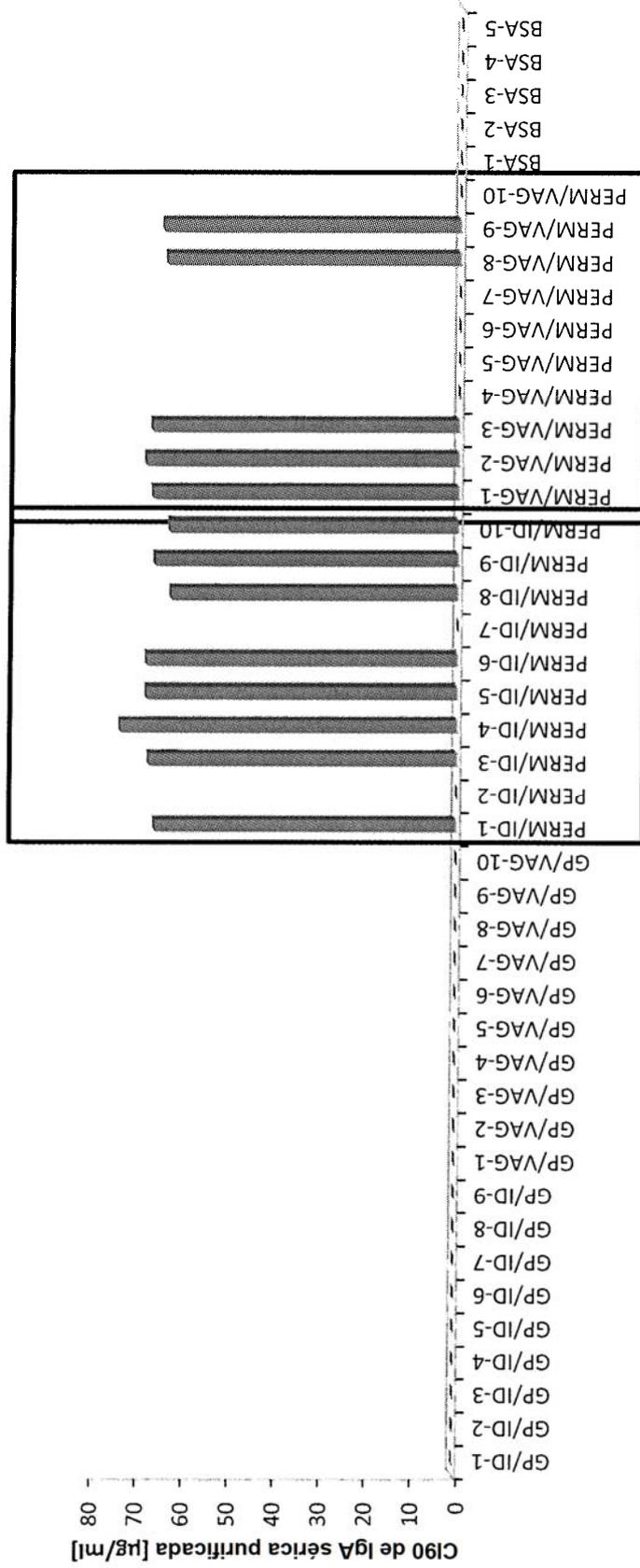
Ala Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser
 115 120

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antígeno de permeasa de *Mycoplasma genitalium* o un polinucleótido que codifica dicho antígeno en forma expresable, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la infección por VIH, en donde dicho antígeno de permeasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y que comprende un epítipo reactivo de forma cruzada con un epítipo de ectodominio de VIH-gp41, y en donde dicho antígeno induce anticuerpos antipermeasa neutralizadores del VIH y reactivos de forma cruzada con el VIH.
- 10 2. El antígeno de permeasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho antígeno de permeasa consiste en la SEQ ID NO: 4.
- 15 3. El antígeno de permeasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho antígeno de permeasa comprende o consiste en la SEQ ID NO: 7.
4. El antígeno de permeasa para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho epítipo de permeasa es reactivo de forma cruzada con un epítipo de ectodominio de VIH-gp41 de la SEQ ID NO: 2.
- 20 5. El polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido comprende la SEQ ID NO: 5 o 6.
- 25 6. El antígeno de permeasa o el polinucleótido que codifica dicho antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el antígeno de permeasa o el polinucleótido están contenidos en una composición inmunogénica o de vacuna que comprende un vehículo y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptables.
7. El antígeno de permeasa o el polinucleótido que codifica dicho antígeno para su uso de acuerdo con 6, en donde la composición inmunogénica o de vacuna comprende un anticuerpo dirigido contra dicho antígeno de permeasa.
- 30 8. El antígeno de permeasa o el polinucleótido que codifica dicho antígeno para su uso de acuerdo con 7, en donde la composición inmunogénica o de vacuna comprende un anticuerpo IgA humanizado.
- 35 9. Un anticuerpo aislado o un fragmento funcional de dicho anticuerpo que comprende al menos el sitio de unión a antígeno, en donde el anticuerpo se dirige contra un antígeno de permeasa de *M. genitalium* que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y que comprende un epítipo reactivo de forma cruzada con un epítipo de ectodominio de VIH-gp41, y en donde dicho anticuerpo es reactivo de forma cruzada con el VIH y es neutralizador del VIH.
- 40 10. El anticuerpo de la reivindicación 9, que es una IgA monoclonal quimérica humana.
11. El anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende un segmento IgVH de la SEQ ID NO: 8 y un segmento IgVL de la SEQ ID NO: 9.



Ratones HAMIGA inmunizados

FIGURA 1

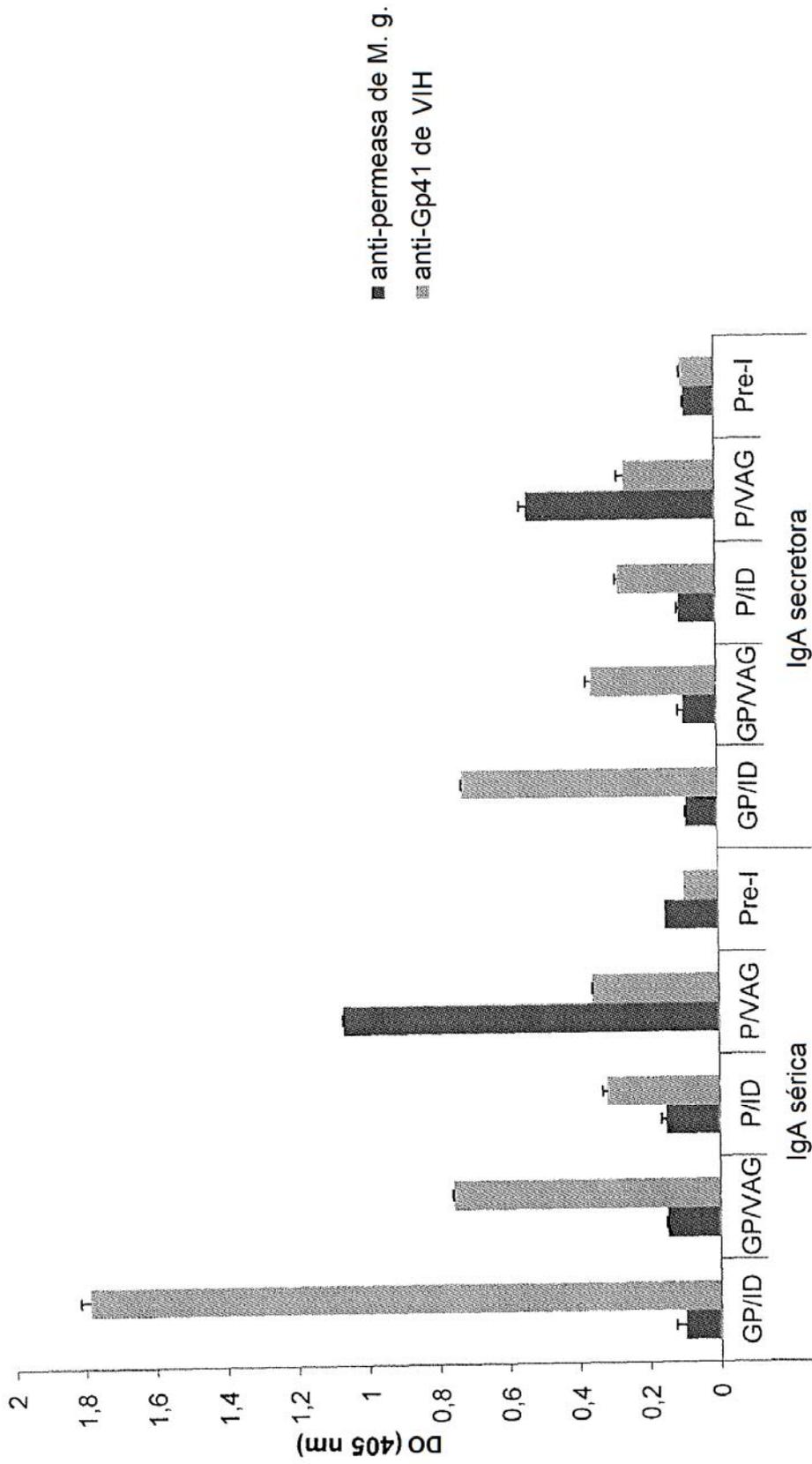


FIGURA 2

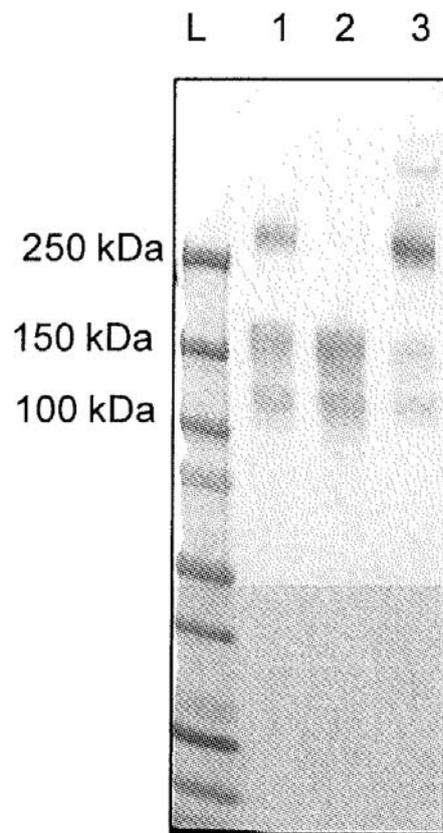


FIGURA 3

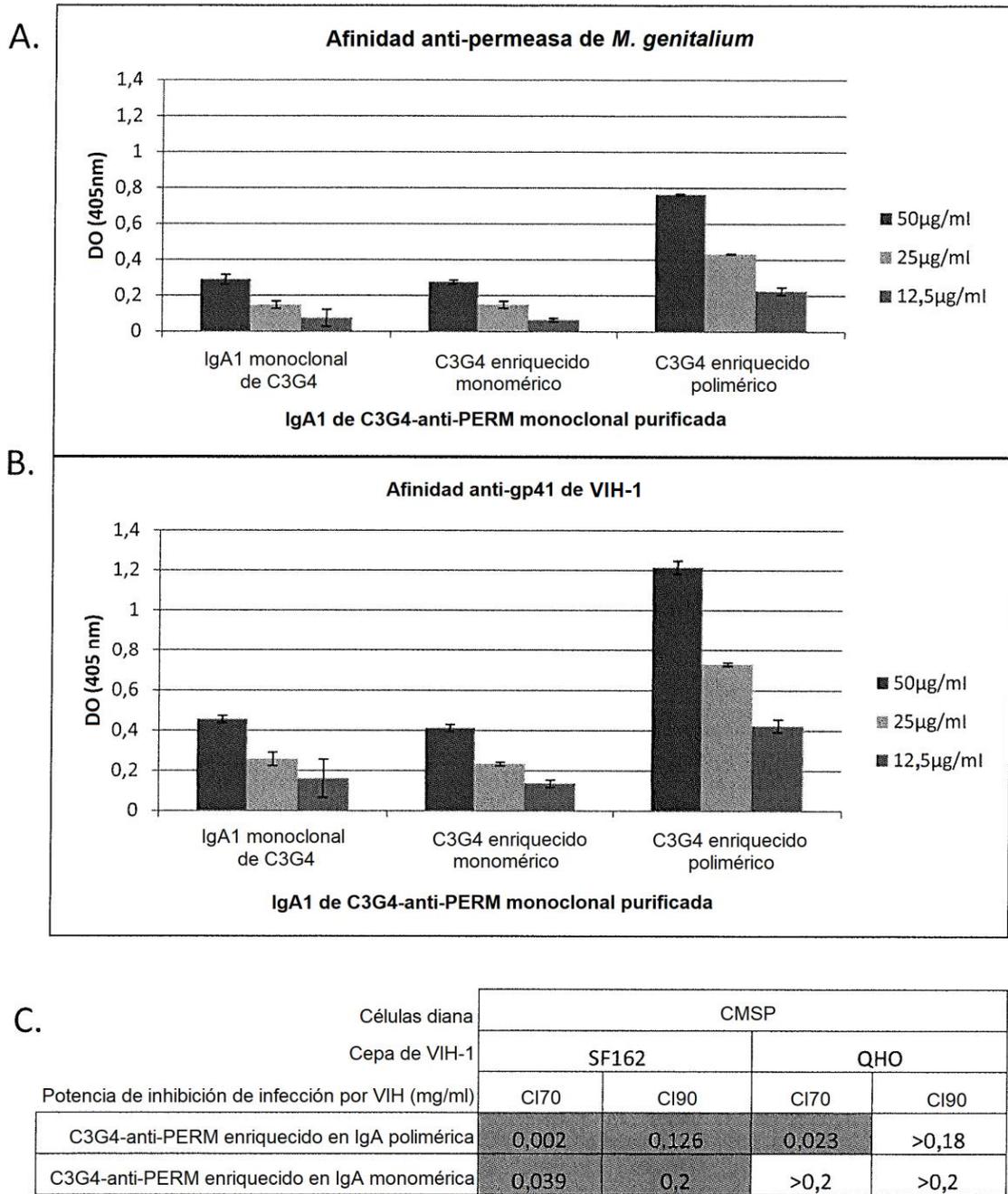


FIGURA 4

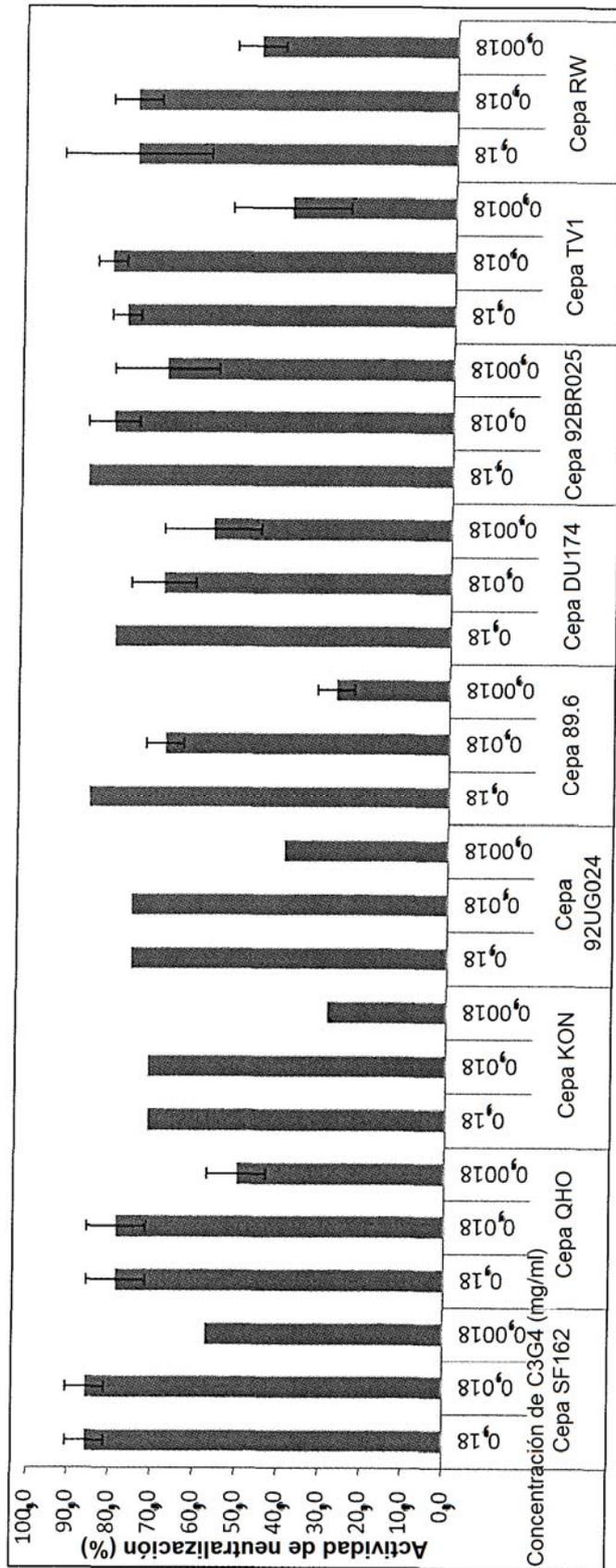


FIGURA 5

