

ANTICUERPOS AMPLIAMENTE NEUTRALIZANTES DIRIGIDOS AL SITIO DE UNIÓN DE CD4 EN LA ENV DEL VIH

CAMPO TÉCNICO

5

La presente invención se relaciona con anticuerpos humanos monoclonales o fragmentos de unión de estos que están dirigidos contra el sitio de unión de CD4 del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1, una composición farmacéutica que comprende tales anticuerpos monoclonales humanos o fragmentos de unión de estos, un kit que comprende
10 tales anticuerpos o fragmentos de unión de estos, y los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de estos y la composición farmacéutica y el kit para usarse como medicamento, y en el tratamiento, cura o prevención de una enfermedad causada por el virus de inmunodeficiencia humana VIH-1.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

A pesar del uso generalizado de la terapia antirretroviral (ART, por sus siglas en inglés) efectiva, el combate contra la epidemia mundial de VIH-1 sigue siendo una prioridad de salud pública. Los anticuerpos anti-VIH-1 altamente potentes y ampliamente neutralizantes
20 (bNAb, por sus siglas en inglés) representan herramientas prometedoras y poderosas que abren oportunidades sin precedentes para estrategias alternativas de tratamiento y prevención. En los últimos años, se han aislado bNAb potentes de donantes infectados por VIH-1 que se unen a distintos epítopos vulnerables en el trímero de la envoltura del VIH-1 (Env). Estos epítopos abarcan el sitio de unión de CD4 (CD4bs, por sus siglas en inglés),
25 el bucle V1/V2, el parche glucano del bucle V3, la región externa membrana-proximal, el péptido de fusión, la cara silenciosa y la interfaz entre las subunidades gp120 y gp41 Env.

Entre estos sitios, el CD4bs es de particular interés debido a que CD4 sirve como el receptor primario para la entrada viral. Los bNAb que se codifican por el segmento génico de la cadena pesada de inmunoglobulina IGHV1-2 a menudo imitan los residuos de contacto CD4 para la proteína de la envoltura viral, muestran altos niveles de hipermutación somática y dependen de una región determinante de complementariedad de cadena ligera de cinco aminoácidos (CDRL3). Estos anticuerpos también se denominan anticuerpos de clase VRC01 y comprenden la mayoría de los bNAb CD4bs más potentes y más amplios identificados hasta la fecha. Debido a sus notables capacidades antivirales, varios bNAb CD4bs han ingresado a la clínica avanzada. Los miembros representativos de la clase VRC01 incluyen VRC01, VRC07, VRC07-523-LS, 3BNC117, NIH45-46, N6 y N49-P7.

Otros bNAb CD4bs se codifican por el segmento génico de cadena pesada de inmunoglobulina IGHV1-46 y no requieren un CDRL3 de cinco aminoácidos. Los miembros representativos de esta clase de anticuerpos son 8ANC131, CH235 y 1 B2530. Estos anticuerpos muestran en su mayoría potencias y amplitud más bajas en comparación con los anticuerpos de clase VRC01.

Una excepción es el bNAb 1-18 recientemente identificado que exhibe altos niveles de potencia y amplitud contra grandes paneles multiclados de referencia de pseudovirus VIH-1.

En modelos animales preclínicos, los bNAb han demostrado una protección robusta contra la infección incluso a niveles bajos de concentraciones séricas y han mostrado perfiles favorables de seguridad y farmacocinética. Además, la administración de los bNAb en individuos infectados por el VIH-1 ha llevado a una supresión prolongada de la viremia y a un rebote viral retardado tras la interrupción del tratamiento analítico (ATI, por sus siglas en inglés). Si bien los ensayos recientes de eficacia de Prevención mediada por anticuerpos (AMP, por sus siglas en inglés) que usaba el bNAb CD4bs VRC01 no demostraron eficacia general en la prevención de la infección por VIH-1, los análisis de subgrupos mostraron la eficacia de VRC01 en la prevención de la infección con cepas sensibles al VRC01 ($IC_{80} < 1 \mu g/ml$). Por lo tanto, la identificación y desarrollo de los bNAb CD4bs altamente potentes es de suma relevancia para la prevención del VIH-1. Estos bNAb necesitan tener potencia de neutralización mejorada,

amplitud y vías de escape virales restringidas. Por lo tanto, sigue existiendo una fuerte demanda para el aislamiento de nuevos bNAb CD4bs que excedan la actividad antiviral de los bNAb anti-VIH-1 conocidos.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar nuevos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos al VIH-1 que exhiben niveles notables de amplitud y potencia contra diversas cepas y subtipos de virus.

Además, un objetivo adicional de esta invención es proporcionar nuevos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra el VIH-1 que limiten la aparición de variantes de escape víricas y sigan siendo efectivos contra dichas variantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Estos objetos han sido resueltos por los aspectos de la presente invención como se especifica de aquí en adelante.

De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este dirigido contra el sitio de unión de CD4 del virus de inmunodeficiencia humana VIH-1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una combinación de la cadena pesada CDR1 a CDR3 y la secuencia de aminoácidos CDR1 a CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo del grupo que comprende **04_A06** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 1, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 2, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 3, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 4, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 5 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 6), **01_D03** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 7, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 8, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la

sec. con núm. de ident. 9, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 10, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 11 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 12), **04_B09** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 13, una

5 secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 14, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 15, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 16, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 17 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 18), **05_C07** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con

10 núm. de ident. 19, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 20, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 21, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 22, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 23 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 24), y **01_B01** (que tiene una CDR-H1 secuencia

15 de aminoácidos de la sec. con núm. de ident. 25, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 26, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 27, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 28, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 29, y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 30).

20 De acuerdo con una modalidad preferida del primer aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una combinación de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de región variable y de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de región variable de un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende

25 **04_A06** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 31 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 41), **01_D03** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 33 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 34),

04_B09 (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 35 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 36),

05_C07 (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 37 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 38),

5 y **01_B01** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 39 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 40).

De acuerdo con una modalidad preferida del primer aspecto de la invención o de la modalidad anterior del primer aspecto de la invención, las secuencias de aminoácidos comprendida en el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este son de un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende 04_A06, 01_D03, 04_B09 y 05_C07, preferentemente de un anticuerpo del grupo que comprende 04_A06, 01_D03, y 04_B09, con mayor preferencia de un anticuerpo del grupo que comprende 04_A06 y 01_D03, de manera particular preferentemente del anticuerpo 04_A06.

15 De acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con una modalidad preferida del segundo aspecto de la invención, la composición farmacéutica es una composición de vacunación para un sujeto humano.

De acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención y un recipiente.

De acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la

presente invención, o un kit de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención para usarse como medicamento.

De acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, o un kit de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención para usarse en el tratamiento o prevención de una infección con el virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 en sujetos mamíferos.

De acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, o un kit de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención para usarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por el virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 en sujetos mamíferos.

En una modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la presente invención, el uso es en sujetos humanos.

En una modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la presente invención, el uso es en el tratamiento o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

De acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

De acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico del séptimo aspecto de la presente invención en asociación funcional con una secuencia de control de la expresión.

De acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención, se proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención o el vector de expresión de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención.

De acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, que comprende cultivar la célula huésped del noveno aspecto de la presente invención en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la actividad neutralizante de anticuerpos de la presente invención contra un panel de 12 cepas de pseudovirus de referencia global del VIH-1 con diferentes secuencias de aminoácidos de envoltura (como se describe en de Camp et al., *J Virol.* marzo de 2014; 88(5): 2489-2507) cuando se probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl (ver más adelante en la sección de Ejemplos); los anticuerpos 04_A06 y 01_D03 como se describe en la presente descripción neutralizan 100 % (12/12) cepas del "Panel global" y muestran altos niveles de potencia.

La Figura 2 muestra la actividad neutralizante (IC_{50}) del anticuerpo 04_A06 de la presente invención contra un panel multiclado de 119 pseudovirus con diferentes secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 cuando se probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl (como se describe en Schoofs et al., *Immunity*, 18 de junio de 2019;50(6):1513-1529.e9); se muestran datos para el anticuerpo 04_A06 en comparación con los bNAb CD4bs más potentes y más amplios de la técnica anterior (3BNC117, 1-18, N49P7, N6, VRC07 y VRC07_{-523-LS}); para su presentación en esta Figura se seleccionaron 99 cepas de pseudovirus del panel multiclado 119 para las cuales se publicaron datos de neutralización de anticuerpos de referencia; Los datos de neutralización de los bNAb de referencia se recuperaron de la base de datos de

neutralización de anticuerpos CATNAP (Yoon et al., Nucleic Acids Research, Volumen 43, Número W1, 1 de julio de 2015, páginas W213-W219, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv404>).

La Figura 3 muestra la actividad neutralizante (IC_{50} y amplitud) del anticuerpo 04_A06 de la presente invención en comparación con anticuerpos anti-VIH-1 de la técnica anterior
5 contra un panel multiclado de 119 pseudovirus con diferentes secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 cuando se probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl (como en la Figura 2, y descrito en Schoofs et al., Immunity, 2019 Jun 18;50(6):1513-1529.e9); para su presentación en esta Figura se seleccionaron 76 cepas de pseudovirus (**A**) o 99 cepas de pseudovirus (**B**) del panel multiclado de 119 para las
10 cuales se publicaron datos de neutralización de anticuerpos de referencia; (**A**) muestra la actividad neutralizante de 04_A06 en comparación con otros bNAb anti-VIH-1 que se dirigen a una gran variedad de diferentes epítomos conocidos, (**B**) presenta la actividad neutralizante del anticuerpo 04_A06 en comparación con los bNAb anti-VIH-1 más potentes y más amplios de la técnica anterior; Los datos de neutralización de los bNAb de referencia
15 se recuperaron de la base de datos de neutralización de anticuerpos CATNAP (Yoon et al., 2015, *supra*).

La Figura 4 muestra la actividad neutralizante (IC_{50}) del anticuerpo 04_A06 de la presente invención contra un panel multiclado de 100 pseudovirus del VIH-1 clado C (panel del Subtipo C) con diferentes secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 cuando se
20 probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl (como se describe en Hraber et al., J Virol., 12 de septiembre de 2017;91 (19):e00991-17); se muestran datos para el anticuerpo 04_A06 en comparación con los bNAb CD4bs más potentes y más amplios de la técnica anterior (3BNC117, 1-18, N6, VRC01 y VRC07-523-LS); Los datos de neutralización de los bNAb de referencia se recuperaron de la base de datos de
25 neutralización de anticuerpos CATNAP (Yoon et al., 2015, *supra*).

La Figura 5 muestra la actividad neutralizante (IC_{50}) del anticuerpo 04_A06 de la presente invención contra un panel de 9 pseudovirus con diferentes secuencias de aminoácidos de la

envoltura del VIH-1 cuando se probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl; se sabe que los pseudovirus de este panel muestran una resistencia extraordinaria contra los bNAb CD4bs; cepas virales de este panel son constituyentes del panel multiclado 119 de pseudovirus y Subtipo C (como se describe en Schoofs et al.,
5 Immunity, 2019 Jun 18;50(6):1513-1529.e9; y Hraber et al., J Virol., 2017 Sep 12;91 (19):e00991-17); se muestran datos para el anticuerpo 04_A06 comparados con los bNAb CD4bs más potentes y más amplios descritos hasta la fecha (VRC07_{-523-LS}, N6, 3BNC117, 1-18, VRC01); Los datos de neutralización de los bNAb de referencia se recuperaron de la base de datos de neutralización de anticuerpos CATNAP (Yoon et al., 2015, *supra*).

10 La Figura 6 muestra la actividad neutralizante (IC₅₀) del anticuerpo 04_A06 de la presente invención contra un panel de 7 pseudovirus con diferentes secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 cuando se probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl; Las cepas de virus ensayadas se seleccionaron de un panel de pseudovirus de referencia que se conoce como “panel resistente a los bNAb CD4bs” y se
15 describe en Zhou et al., PLoS Patog. 13 de junio de 2019;15(6):e1007819. doi: 10.1371/journal.ppat.1007819. PMID: 31194843; PMCID: PMC6592578 12 de septiembre de 2017;91 (19):e00991-17; los pseudovirus de este panel de referencia publicado muestran una resistencia extraordinaria contra los bNAb CD4bs; se muestran datos para el anticuerpo 04_A06 en comparación con los bNAb CD4bs más potentes y más amplios
20 de la técnica anterior (VRC07, N6, NIH45-46, 1-18, VRC01, N49P7, 3BNC117); todos los anticuerpos se probaron por duplicado en ensayos independientes.

La Figura 7 muestra la actividad neutralizante (IC₅₀) del anticuerpo 01_D03 de la presente invención contra un panel de 8 pseudovirus con diferentes secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 cuando se probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus
25 de células TZM-bl; cepas virales de este panel son constituyentes de 119 multiclado (como se describe en Schoofs et al., Immunity, 2019 Jun 18;50(6):1513-1529.e9); los pseudovirus seleccionados de este panel son insensibles a la neutralización por los bNAb

CD4bs; la insensibilidad frente a la neutralización de anticuerpos se definió por una $IC_{50} > 1 \mu\text{g/ml}$; se muestran datos para el anticuerpo 01_D03 comparados con los bNAb CD4bs más potentes y más amplios de la técnica anterior (VRC07-523-LS, N6, VRC07, N49P7, 1-18); todos los anticuerpos se probaron por duplicado en ensayos independientes, los datos de neutralización de los bNAb de referencia se recuperaron de la base de datos de neutralización de anticuerpos CATNAP (Yoon et al., 2015, *supra*).

La Figura 8 muestra la actividad neutralizante (IC_{50} e IC_{80}) del anticuerpo 04_A06 de la presente invención contra un panel de 185 pseudovirus con diferentes secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 cuando se probó en el ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl; las cepas virales de este panel de pseudovirus se generaron a partir de secuencias de virus obtenidas de los Ensayos de Prevención Mediada por Anticuerpos (como se describe en Corey L, Dos ensayos aleatorios de anticuerpos neutralizantes para prevenir la adquisición del VIH-1. N Engl J Med. 18 de marzo de 2021;384(11):1003-1014. doi: 10.1056/NEJMoa2031738. PMID: 33730454; PMCID: PMC8189692); se muestran datos para el anticuerpo 04_A06 comparados con la referencia bNab VRC01; los datos de neutralización de otros bNAb de referencia no estaban a disposición del público; Los datos de neutralización del bNAb VRC01 de referencia se recuperaron de Corey L, Dos ensayos aleatorios de anticuerpos neutralizantes para prevenir la adquisición del VIH-1. N Engl J Med. 18 de marzo de 2021;384(11):1003-1014. Doi: 10.1056/NEJMoa2031738. PMID: 33730454; PMCID: PMC8189692.

La Figura 9 muestra los números de copias plasmáticas de ARN del VIH-1 (arriba) y su cambio lógico (abajo, en comparación con la línea de base (número de copias plasmáticas de ARN del VIH-1 del día -1)) en ratones humanizados infectados con VIH-1_{YU2} (virus NL4-3 con gen de envoltura sustituido por el de YU2); los ratones se trataron por vía subcutánea con una dosis de carga de 1 mg por anticuerpo, seguida de inyecciones subcutáneas de 0,5 mg por anticuerpo cada 3-4 días; ratones tratados con los anticuerpos CD4bs conocidos VRC01 y

VRC07 muestran una reducción transitoria de viremia, seguida de un rápido rebote viral; en contraste, los ratones tratados con el anticuerpo 04_A06 de la invención solo muestran una reducción persistente de viremia a lo largo del periodo de tratamiento de 84 días; las líneas negras indican el cambio lógico medio.

5 La Figura 10 muestra los números de copias plasmáticas de ARN del VIH-1 (arriba) y su cambio lógico (abajo, en comparación con el valor basal (número de copias plasmáticas de ARN del VIH-1 en el día 28)) en ratones humanizados infectados con el VIH-1_{YU2} (NL4-3/YU2) que se trataron previamente con el anticuerpo VRC01 del sitio de unión de CD4 (como se muestra en la Figura 8); después de cuatro semanas de tratamiento, se añadió
10 el anticuerpo 04_A06 al régimen de tratamiento previo que se mantuvo durante todo el proceso;

04_A06 se administró por vía subcutánea con una dosis de carga de 1 mg, seguida de 0,5 mg cada 3 días a 4 días; a pesar del rebote viral después del pretratamiento con el anticuerpo VRC01 del sitio de unión de CD4, el tratamiento con el anticuerpo 04_A06 dio como resultado
15 una supresión viral mantenida en todos los animales tratados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los presentes inventores se dedicaron a resolver el problema de la presente invención y
20 tuvieron éxito en encontrar anticuerpos monoclonales humanos novedosos y útiles contra el VIH-1 que superen las desventajas y deficiencias de los anticuerpos conocidos.

En la presente, los inventores describen nuevos anticuerpos del sitio de unión de CD4 que exceden la potencia y amplitud de los bNAbs CD4bs conocidos tales como el anticuerpo 1-18 tal como se describe en WO 2021/110764 A1 u otros. Estas propiedades no tienen
25 precedentes y abren nuevas posibilidades para terapias basadas en anticuerpos y prevención de la enfermedad asociada al VIH-1.

Por lo tanto, la presente invención proporciona en un primer aspecto un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este dirigido contra el sitio de unión de CD4 del virus de inmunodeficiencia humana VIH-1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una combinación de la cadena pesada CDR1 a CDR3 y la secuencia de aminoácidos CDR1 a CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo del grupo que comprende **04_A06** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 1, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 2, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 3, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 4, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 5 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 6), **01_D03** (con una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 7, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 8, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 9, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 10, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 11 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 12), **04_B09** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 13, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 14, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 15, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 16, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 17 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 18), **05_C07** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 19, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 20, una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de la sec. con núm. de ident. 21, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 22, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 23 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 24), y **01_B01** (que tiene una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de la sec. con núm. de ident. 25, una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de la sec. con núm. de ident. 26, una secuencia de aminoácidos CDR-

H3 de la sec. con núm. de ident. 27, una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de la sec. con núm. de ident. 28, una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de la sec. con núm. de ident. 29 y una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de la sec. con núm. de ident. 30).

Dentro del contexto de la presente invención, los anticuerpos, que se generaron y describieron en la presente, pueden usarse y reivindicarse como el anticuerpo humano monoclonal completo o como cualquier fragmento funcional o de unión de este. Preferentemente, el anticuerpo humano monoclonal o cualquier tipo de fragmento funcional o de unión al antígeno de este debería comprender al menos las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1 a 3 de la cadena pesada y CDR 1 a 3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano.

Las regiones CDR de las secuencias de anticuerpos descritas en la presente se definen preferentemente de acuerdo con el esquema de numeración de IMGT que es una adaptación del esquema de numeración de Chothia (ImmunoGenetics information system®; Lefranc et al., NAR 27: 209-212 (1999); <http://www.imgt.org>).

De acuerdo con la presente invención, las secuencias CDR de las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente son las siguientes:

Fuente	CDR1	sec. con núm. de ident. CDR1	CDR2	sec. con núm. de ident. CDR2	CDR3	sec. con núm. de ident. CDR3
Cadena pesada 04_A06	DSFTVYRPRLS AFIGEFN	1	VNIFRG AV	2	AWDKNVDDN PWRLDS	3
Cadena ligera	QDVGWA	4	TAH	5	QVFDS*	6

04_A06						
Cadena pesada 01_D03	GYSFRDYR	7	MQPRY GAV	8	VTHKLYDGE DASDLTWRL DP	9
Cadena ligera 01_D03	QDITNA	10	DGS	11	QHYEF**	12
Cadena pesada 04_B09	AFIGEFN	13	VNIFRG AV	14	AWDKNVDDN PWRLDS	15
Cadena ligera 04_B09	QDVGWA	16	TTS	17	QVFES*	18
Cadena pesada 05_C07	GYTFRDYR	19	LHPAY GAV	20	VTHKLYDGE DASDLTWRL DP	21
Cadena ligera 05_C07	QDITNA	22	DGS	23	QHYEF**	24
Cadena pesada 01_B01	GYSFRDYR	25	IQPRY GAV	26	VTHKLYDGE DASDLAWRL DP	27
Cadena ligera 01_B01	QDITNA	28	DGS	29	QHYEF**	30

* La CDRL3 de los anticuerpos 04_A06 y 04_B09 no se pudo determinar con precisión usando el software IMGT. Se supone que la razón radica en el hecho de que las secuencias específicas no cumplieron con los criterios del esquema de numeración y definición de secuencia CDR3 de IMGT. Las secuencias CDRL3 de 04_A06 y 04_B09 como se indica en la presente se definen en el supuesto de una sustitución de aminoácidos en el motivo de la región J (F/W-G-X-G) de F-**G**-P-G a F-**A**-P-G y en

comparación con secuencias de genes de otros bNAb CD4bs codificados por IGHV1-2 e IGKV1-33.

** La CDRL3 del anticuerpo 01_D03, 05_C07 y 01_B01 no se pudo determinar con precisión usando el software IMGT. Se supone que el motivo radica en el hecho de que la secuencia específica no cumplía con los criterios del esquema de numeración y definición de secuencia CDR3 de IMGT. La secuencia CDRL3 de 01_D03 como se indica en la presente se define en el supuesto de una sustitución de aminoácidos en el motivo de la región J (F/W-G-X-G) de F-**G-P-G** a F-**P-P-V** y en comparación con secuencias génicas de otros bNAb CD4bs codificados por IGHV1-2 e IGKV1-33. Las secuencias CDRL3 de 05_C07 y 01_B01 como se indica en la presente se definen en el supuesto de una sustitución de aminoácidos en el motivo de la región J (F/W-G-X-G) de F-**G-P-G** a F-**P-P-A** y en comparación con secuencias de genes de otros bNab CD4bs codificados por IGHV1-2 e IGKV1-33.

También, una modalidad preferida del primer aspecto de la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno dirigidos contra el sitio de unión de CD4 del VIH-1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende la combinación de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de región variable y de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de región variable de un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende **04_A06** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 31 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 32, o preferentemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 31 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera definida por sec. con núm. de ident. 41), **01_D03** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 33 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 34), **04_B09** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 35 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 36), **05_C07** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 37 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 38), y **01_B01** (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 39 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 40).

De acuerdo con la presente invención, las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos preferidos y fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente con las designaciones internas 04_A06, 01_D03, 04_B09, 05_C07 y 01_B01 son las siguientes:

5

Sec. con núm. de ident.	Fuente	Secuencia
31	Dominio variable de cadena pesada 04_A06	SVRLDQSGTAVKKPGASVRVSCRAPDSFTVYRPRLSA YFIGEFNIHW LRQAPGQGLEWLGFVNIFRGAVKYSSRFQGRITITRDT SSETSYLDL GALKADDTATYYCAWDKNVDDNPWRLDSWGQGTSLVI VSS
32	Dominio variable de cadena ligera 04_A06	YIQVTQSPSSLSASIGDTITVACEVSQDVGWAVNWWYH QRPGRPPYN LIYTAHNLAPGVASRFRGSRVGTFTLTINNLLPEDVG TYYCQVFDSF APGGTRVDL
33	Dominio variable de cadena pesada 01_D03	HVQLWQSGAEVKKPGASVKISCSAWGFGTTSGYSFR DYRVHWVRH IAGQGFQWMGHMQPRYGAVNYARQFQGRITMTREV SFDASGGTAY MELRSLRSDDTAVYYCVTHKLYDGEDASDLTWRLDP WGQGTRVIVS S
34	Dominio variable de cadena ligera	GVHLTQSPASLSASVGDRVTFTCQASQDITNAINWYQ LRPGKTPKL

	01_D03	MIHDGSTLRRGVPSRFAGSGFGTKFTFTIDNLQPEDLA TYFCQHYEF FPPVGTQVELN
35	Dominio variable de cadena pesada 04_B09	SVRLDQSGTAVKKPGASVRVSCRAPDSFTVYRPRLSA YFIGEFNIHW LRQAPGQGLEWLGFVNIFRGAVKYSSAFRGRITITRDT SLETSYLDLG ALKPDDTATYFCAWDKNVDDNPWRLDSWGQGTLVW SS
36	Dominio variable de cadena ligera 04_B09	YIQVTQSPSSLSASVGDTITVACQVSQDVGWAVNWH QRPGRPPY NLIYTTSNLAPGVASRFRGTRVATYFTLTINNLLPEDVG TYYCQVFES FAPGGTRVDLR
37	Dominio variable de cadena pesada 05_C07	HVQLWQSGAEVKKPGASVKISCSAWGFGTRSGYTFR DYRIHWVRQ VPRQGFEWMGHLHPAYGAVNYARQFQGRIIMTREVS FDGSGGTVY MELRSLRSDDTATYYCVTHKLYDGEDASDLTWRLDP WGQGTRVTV SS
38	Dominio variable de cadena ligera 05_C07	GVSLTQSPASLCASVGDRVTFCTQASQDITNAINWYQ LRPGKTPKL MIHDGSTLRRGVPSRFAGSGFGTRFTFTIDNLQPEDLA TYFCQHYEF FPPAGTQVDFN
39	Dominio variable de cadena pesada 01_B01	HVQLWQSGAEVKKPGASVKISCAAWGFGTTSGYSFR DYRIHWVRQ VPGQGFQWMGHIQPRYGAVNYAHQFQGRITMTREVS FDASGGTAY

		MELRSLRSDDTATYYCVTHKLYDGEDASDLAWRLDP WGQGTRVTV SS
40	Dominio variable de cadena ligera 01_B01	GVHLTQSPASLSASVGDRVTFTCQASQDITNAINWYQ LRPGKTPKL MIHDGSTLRRGVPSRFAGGGFGTKFTFTIDNLQPEDL ATYFCQHYES FPPAGTQVELN
41	Dominio variable de cadena ligera 04_A06	YIQVTQSPSSLSASIGDTITVACEVSQDVGWAVNWWYH QRPGRPPYN LIYTAHNLAPGVASRFRGSRVGTFTLTINNLLPEDVG TYYCQVFDSF APGGTRVDLR

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo 04_A06 (sec. con núm. de ident. 31). De acuerdo con una

5 modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo 01_D03 (sec. con núm. de ident. 33). De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una

10 secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo 04_B09 (sec. con núm. de ident. 35). De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo 05_C07 (sec. con núm. de ident. 37). De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o

15 fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo 01_B01 (sec. con núm. de ident. 39).

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo 04_A06 como se define por la sec. con núm. de ident. 32. De acuerdo con una modalidad alternativa y preferida de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo 04_A06 como se define por la sec. con núm. de ident. 41. De acuerdo con esta modalidad, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 04_A06 puede definirse preferentemente en la presente como la sec. con núm. de ident. 41. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo 01_D03 (sec. con núm. de ident. 34). De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo 04_B09 (sec. con núm. de ident. 36). De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo 05_C07 (sec. con núm. de ident. 38). De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo 01_B01 (sec. con núm. de ident. 40).

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 31 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 32. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 31 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 41. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo

o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 33 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 34. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 35 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 36. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 37 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 38. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 39 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la sec. con núm. de ident. 40.

De acuerdo con una modalidad específica de la presente invención, el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas de secuencia de la sec. con núm. de ident. 31 y dos cadenas ligeras de secuencia de la sec. con núm. de ident. 32, o el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas de secuencia de la sec. con núm. de ident. 31 y dos cadenas ligeras de secuencia de la sec. con núm. de ident. 41, o el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas de secuencia de la sec. con núm. de ident. 33 y dos cadenas ligeras de secuencia de la sec. con núm. de ident. 34, o el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas de secuencia de la sec. con núm. de ident. 35, o el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas de secuencia de la sec. con núm. de ident. 36, o el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas de secuencia de la sec. con núm. de ident. 37 y dos cadenas ligeras de secuencia de la sec. con núm. de ident. 38, o el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas de secuencia de la sec. con núm. de ident. 39 y dos cadenas ligeras de secuencia de la sec. con núm. de ident. 40.

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo usado como fuente para secuencias comprendas en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que comprende 04_A06, 01_D03, 04_B09 y 05_C07, preferentemente del grupo que comprende 04_A06, 01_D03 y 04_B09, con mayor preferencia del grupo que comprende 04_A06 y 01_B09, con mayor preferencia del grupo que comprende 04_A06 y 01_D03, de manera particular preferentemente es el anticuerpo 04_A06.

En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo usado como fuente para secuencias comprendas en el anticuerpo de la invención es 04_A06. En otra modalidad de la presente invención, el anticuerpo usado como fuente para secuencias comprendidos en el anticuerpo de la invención es 01_D03. En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo usado como fuente para secuencias comprendidos en el anticuerpo de la invención es 04_B09. En otra modalidad de la presente invención, el anticuerpo usado como fuente para secuencias comprendidos en el anticuerpo de la invención es 05_C07. En otra modalidad de la presente invención, el anticuerpo usado como fuente para secuencias comprendas en el anticuerpo de la invención es 01_B01.

En una modalidad preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este que conserva la especificidad de unión y la capacidad para neutralizar el patógeno infeccioso. En una modalidad preferida, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo que comprende un dominio Fc de cualquier isotipo IgG humano (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

Opcionalmente, el compuesto de unión a antígenos consiste en o comprende un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab)2, Fv, un diacuerpo, fragmento de anticuerpo monocatenario, o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples fragmentos de anticuerpo diferentes.

Dentro de la presente invención, un anticuerpo o fragmento de unión dirigido contra el sitio de unión de CD4 del VIH-1 significa una unión de anticuerpo a la región del sitio de unión de CD4 dentro de la glicoproteína de la envoltura gp120 del VIH-1 con una afinidad al menos 10 veces,

con mayor preferencia al menos 50 veces, de manera particular preferentemente al menos 100 veces mayor de afinidad en comparación con epítomos, proteínas o regiones proteicas no relacionados. En general, el término sitio de unión de CD4 en la presente designa la región del sitio de unión de CD4 dentro de la glicoproteína de la envoltura gp120 del VIH-1.

5 La presente invención proporciona además y abarca anticuerpos humanos monoclonales o fragmentos de unión que comprenden secuencias de aminoácidos de anticuerpos que son al menos 80 % idénticas a las secuencias tal como se definen y describen en la presente, siempre que todavía se dirigen contra el sitio de unión de CD4 del virus de inmunodeficiencia humana VIH-1. Esto pretende incluir secuencias que tienen mutaciones triviales de la secuencia de
10 aminoácidos del anticuerpo que no interfieren con los pliegues estructurales y la afinidad del anticuerpo con el sitio de unión de CD4.

Común y preferentemente, tales mutaciones que no interfieren sustancialmente con la estructura y función del anticuerpo se encuentran fuera de las CDR del anticuerpo, más preferiblemente tales mutaciones se encuentran fuera de las CDR y fuera de las regiones
15 marco del anticuerpo. Por consiguiente, se prefiere que las secuencias de aminoácidos de anticuerpos que son al menos 80 % idénticas a las secuencias tal como se definen en la presente no porten mutaciones en las CDR, con mayor preferencia no en las CDR o en las regiones marco del anticuerpo, si alguna de las mutaciones está presente en absoluto.

Es una tarea trivial para una persona experta determinar si un anticuerpo que exhibe un
20 cierto grado de identidad se dirige contra el sitio de unión de CD4 del virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 basado en lo anterior o en el conocimiento general común.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se logra de acuerdo con la presente invención usando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci.
25 USA (1993) 90: 5873-5877). Tal algoritmo es la base de los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al. (J. Mol. Biol. (1990) 215: 403-410). Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa BLASTN. Para obtener alineaciones con espacio para fines

comparativos, se usa Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389-3402). Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros predeterminados de los programas respectivos.

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, las secuencias de aminoácidos de anticuerpos forman parte de la invención que consisten en o comprenden una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85 % idéntica a las secuencias definidas anteriormente y divulgadas en la presente, con mayor preferencia al menos 90 % idéntica, aun con mayor preferencia al menos 95 % idéntica. De acuerdo con una modalidad preferida, las mutaciones en la secuencia de aminoácidos que pueden conducir a una identidad de secuencia de menos de 100 % se encuentran fuera de las CDR desveladas en la presente, con mayor preferencia tales mutaciones se encuentran fuera de la CDR y las regiones marco de las secuencias de anticuerpos descritas en la presente.

Dentro de la presente invención, los anticuerpos descritos se prueban para determinar su actividad neutralizante frente a una amplia selección de pseudovirus. El ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl usado para estudiar la amplitud y la fuerza de neutralización es un ensayo altamente estandarizado que se usa comúnmente en la técnica y en el campo técnico de la invención para un análisis de la potencia de neutralización de anticuerpos contra diversas cepas del VIH-1. En resumen, los anticuerpos y las cepas de virus se incuban juntos antes de que se añaden células diana TZM-bl. Estas células exhiben actividad luciferasa en caso de una infección exitosa, dando como resultado una señal de luminiscencia detectable en presencia de luciferina después de la lisis de las células. Los anticuerpos neutralizantes son capaces de prevenir la infección y por lo tanto la generación de luminiscencia. La potencia de un anticuerpo neutralizante está determinada por la concentración del anticuerpo requerida para reducir la infectividad del virus en una cantidad particular.

Una manera ejemplar y estandarizada de establecer y emplear este ensayo se describe en detalle en Sarzotti-Kelsoe et al.; J Immunol Methods. julio de 2014; 0: 131-146.

doi:10.1016/j.jim.2013.11.022. Preferentemente, el método descrito en la sección “Ejemplos” a continuación se usa para determinar la actividad neutralizante. Esta descripción sola y en combinación con la técnica anterior común permite al experto establecer y determinar una lectura concluyente del ensayo de neutralización de pseudovirus de células TZM-bl como se usa en la presente descripción.

La potencia de neutralización como se define en la presente preferentemente toma en cuenta solo aquellas variantes de virus que podrían determinarse positivamente como neutralizadas por los anticuerpos respectivos. A partir de la selección de variantes neutralizadas positivamente, se determina entonces una media geométrica IC_{50} a través de las cepas neutralizadas.

De acuerdo con una modalidad preferida del primer aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una combinación de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de región variable y de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de región variable del anticuerpo 04_A06 (que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 31) y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera definida por la sec. con núm. de ident. 32, o que consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la sec. con núm. de ident. 31 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera definida por la sec. con núm. de ident. 41).

Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno como se describe en la presente son mamíferos, con mayor preferencia humanos. Más preferentemente, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno como se describe en la presente son monoclonales, y pueden usarse y administrarse de una manera monoclonal, es decir, sin una administración concurrente o solapante de otro anticuerpo monoclonal a un paciente.

De manera alternativa, preferentemente, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más anticuerpos monoclonales diferentes, p. ej., en una administración concurrente o

solapada, de manera que todos dichos anticuerpos entreguen sus efectos concomitantemente.

En la descripción de la presente solicitud, pueden usarse designaciones de anticuerpos.

Se señala que los anticuerpos consisten en cadenas pesadas y ligeras que también
5 forman parte de la presente descripción. Si se hace referencia a un anticuerpo por su designación o a una sec. con núm. de ident., debe entenderse que estas maneras de referencia son intercambiables.

La presente invención se relaciona además en un segundo aspecto a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de
10 acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención es una composición de vacunación para un sujeto humano.

Preferentemente, la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la
15 presente invención puede comprender además uno o más anticuerpos dirigidos contra un epítopo diferente dentro del VIH-1, preferentemente dirigidos contra el trómero de la envoltura del VIH-1 (Env), con mayor preferencia dirigidos contra el sitio de glicano V3.

La presente invención también abarca en un tercer aspecto un kit que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la
20 presente invención y un recipiente.

En un cuarto aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto, y el kit de acuerdo con el
tercer aspecto de la presente invención son para usarse como medicamento.

25 En un quinto aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto, y el kit de acuerdo con el

tercer aspecto de la presente invención son para usarse en el tratamiento o prevención de una infección con el virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 en sujetos mamíferos.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto, y el kit de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención son para usarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por el virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 en sujetos mamíferos.

En una modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la presente invención, el uso es en sujetos humanos.

En otra modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la presente invención, el uso es para vacunación y/o en forma de una composición de vacunación. En otra modalidad preferida del quinto o sexto aspecto de la presente invención, el uso es en el tratamiento o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

En un otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 en sujetos humanos, preferentemente para usarse en el tratamiento o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en sujetos humanos, en donde al paciente se le administra una cantidad efectiva del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de la invención.

En otro aspecto, la presente invención también se dirige al uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por el virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 en sujetos humanos, preferentemente para el tratamiento o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en sujetos humanos.

De acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

De acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico del séptimo aspecto de la presente invención en asociación funcional con una secuencia de control de la expresión.

De acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención, se proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención o el vector de expresión de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención.

De acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, que comprende cultivar la célula huésped del noveno aspecto de la presente invención en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

Todas las modalidades de la presente invención como se describe en la presente se consideran combinables en cualquier combinación, a menos que el experto considere que tal combinación no tiene ningún sentido técnico.

Ejemplos

A) Métodos experimentales

Aislamiento de secuencias de anticuerpos monoclonales

Se obtuvieron muestras de sangre y leucoféresis bajo protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Colonia (protocolos 13-364 y 16-054) y el participante proporcionó consentimiento informado por escrito. Las células mononucleares de

sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad y se almacenaron a -150 °C en 90 % de FBS y 10 % de DMSO. Las células B se aislaron de PBMC por separación celular magnética y se marcaron con CD19-AF700 antihumano, IgG-APC antihumano, DAPI (BD), y una proteína de cebo VIH-1 Env durante 30 minutos en hielo.

La proteína de cebo del VIH-1 Env era BG505_{SOSIP.664}-GFP (Sliepen K et al., *Biomolecules*, 2015 Oct 23;5(4):2919-34) o biotinilada (EZ-Link Sulfo NHS Biotinylation and Labeling Kit, Thermo Fisher) YU2_{gp140} (Yang et al., *J Virol.* junio de 2000;74(12):5716-25. doi: 10.1128/jvi.74.12.5716-5725.2000) que se etiquetó con estreptavidina-PE. Las células individuales CD19⁺IgG⁺ DAPI⁻ reactivas Env se clasificaron como se describió anteriormente (Gieselmann et al., *Nat Protoc.* julio de 2021;16(7):3639-3671. doi: 10.1038/s41596-021-00554-w.). Las células clasificadas se incubaron con cebador hexamérico aleatorio, NP-40, y H₂O libre de RNasa durante 1 min a 65 °C. Posteriormente, se generó ADNc usando Superscript IV en presencia de regulador de RT, dNTP, DTT, H₂O, RNasin y RNaseOUT. Las secuencias de anticuerpos para análisis de células individuales se amplificaron mediante PCR semianidadas usando la polimerasa Taq y los cebadores previamente descritos CG_RT (Ozawa et al., *Biotechniques.* abril de 2006; 40(4):469-70, 472, 474 passim, doi: 10.2144/000112123, primera PCR), IgG_Internal RT (Tiller et al., *J Immunol Methods.* 1 de enero de 2008; 329(1-2):112-24. doi: 10.1016/j.jim.2007.09.017. Epub 31 de octubre de 2007., segunda PCR), y la mezcla OPT5/oPR-Primer (Kreer et al., *J Immunol Methods.* mayo 2020;480:112752. doi: 10.1016/j.jim.2020.112752, both PCRs)

Análisis de secuencia de anticuerpos

Las secuencias de productos de segunda PCR con una puntuación Phred media > 28 y una longitud mínima de 240 nucleótidos se anotaron con IgBlast (Ye et al., 2013) y se recortaron de la región marco (FWR, por sus siglas en inglés) 1 de la región variable hasta el final del gen J. Las llamadas base con una puntuación Phred <16 estaban enmascaradas y las secuencias

con >15 nucleótidos enmascarados, desfases de marco o codones de parada se excluyeron de análisis posteriores. Para analizar las secuencias para posibles clonalidades, todas las secuencias productivas de la cadena pesada se agruparon por genes V idénticos y se determinó la distancia de Levenshtein por pares de sus CDRH3.

- 5 Las secuencias individuales se agruparon en clones cuando compartían el mismo gen V y tenían una identidad CDRH3 mínima de 75 %. Después de 10 rondas con una entrada aleatoria de secuencias se seleccionó el resultado que arrojó el menor número de secuencias no asignadas (no clonales) para análisis posteriores. Todos los clones fueron revalidados manualmente por los investigadores para identificar mutaciones compartidas.
- 10 Las secuencias que inicialmente se asignaron a diferentes clones pero que compartían los mismos genes VDJ y mutaciones de aminoácidos y/o nucleótidos silenciosas se agruparon posteriormente en subclones. La identidad de secuencia de nucleótidos a la línea germinal se calculó usando IgBLAST.

15 Producción de anticuerpos monoclonales

- Para la clonación de anticuerpos derivados de células individuales, se usó como plantilla el producto de PCR de la primera PCR de una sola célula y se amplificó usando polimerasa Q5 de alta fidelidad y cebadores específicos directo e inverso que se asemejaban a la secuencia de nucleótidos respectiva de las regiones V y J (Giesermann et al., 2021, *supra*) con voladizos
- 20 de vectores de expresión para posterior clonación independiente de secuencia y ligación (SLIC, por sus siglas en inglés). Los productos de PCR se clonaron en vectores de expresión de anticuerpos humanos (IgG1, kappa o cadena lambda) mediante ensamblaje SLIC como se describió anteriormente (von Boehmer et al., Nat Protoc. octubre de 2016;11 (10):1908-1923. doi: 10.1038/nprot.2016.102). Los anticuerpos se produjeron en células HEK293-6E por
- 25 transfección usando polietilenimina. Después de 5-7 días, los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes después de la incubación de la proteína G y posterior elución de columnas de cromatografía usando glicina 0,1 M (pH = 3,0). Después de la neutralización del tampón, el

intercambio de regulador a PBS y la esterilización por filtro, los anticuerpos se almacenaron a 4 °C.

Producción de pseudovirus

5 Se produjeron pseudovirus en células HEK293T por cotransfección con plásmido pSG3AEnv como se describió anteriormente (Doria-Rose et al., PLoS Patog. 4 de enero de 2017;13(1):e1006148. doi: 10.1371/journal.ppat; Sarzotti-Kelsoe et al., J Immunol Methods. julio de 2014;409:131-46. doi: 10.1016/j.jim.2013.11.022; Hraber et al., J Virol. 12 de septiembre de 2017;91 (19):e00991-17. doi: 10.1128/JVI.00991-17.; Seaman et al., J
10 Virol. febrero de 2010;84(3):1439-52. doi: 10.1128/JVI.02108-09).

Ensayo de neutralización celular TZM-bl

Los ensayos de neutralización se realizaron como se describió previamente (Sarzotti-Kelsoe et al., 2014, *supra*; Seaman et al., 2010, *supra*). Se usó el virus pseudotipo del virus
15 de la leucemia murina (MuLV) para determinar la actividad no específica. Los anticuerpos se probaron en duplicados. Para el panel de referencia global, se determinó la bioluminiscencia después de añadir un tampón de luciferina/lisis (MgCl₂ 10 mM, ATP 0,3 mM, Coenzima A 0,5 mM, IGEPAL 17 mM (todos Sigma-Aldrich), y D-Luciferina 1 mM
20 (GoldBio) en Tris-HCl).

Ratones humanizados infectados por VIH-1

Se generaron ratones humanizados como se describió previamente (Klein et al., 2012) con modificaciones. Los ratones NOD.Cg-*Rag1*^{tm1mom}//*2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NRG) se humanizaron dentro
25 de los cinco días posteriores al nacimiento y 3-6 horas después de la irradiación subletal mediante inyección intrahepática de sangre de cordón umbilical hematopoyético humano CD34⁺ y/o células madre de tejido placentario. Los ratones humanizados se infectaron por

desafío intraperitoneal usando VIH-1_{YU2} recombinante competente para la replicación (YU2 env) en la columna vertebral NL4-3 (Zhang et al., J Virol. junio de 2002;76(12):6332-43. doi: 10.1128/jvi.76.12.6332-6343.2002) que se recolectó de sobrenadantes de células HEK293T transfectadas.

5

Mediciones de carga viral del VIH-1

El ARN plasmático se extrajo de muestras de plasma EDTA usando el Mini Spin Kit de Spin Virus MineLute que incluye una etapa de digestión de ADNasa I en columna. Las cargas virales se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores pol-específicos descritos anteriormente (Horwitz et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 8 de octubre de 2013;110(41):16538-43. doi: 10.1073/pnas.1315295110). La qPCR se realizó en un QuantStudio 5 usando el kit Taqman ARN a Ct 1 -Step-Kit. Las cargas virales se cuantificaron mediante la inclusión de una curva estándar derivada de una muestra de número de copias conocido con cada ejecución de qPCR. El límite de precisión de la qPCR se determinó como 784 copias/ml.

15

Tratamiento con anticuerpos de ratones humanizados infectados por el VIH-1

Los anticuerpos diluidos en PBS se inyectaron por vía subcutánea. Después de una dosis de carga de 1 mg, se inyectaron dosis de 0,5 mg cada 3-4 días.

20

B) Ejemplos específicos de anticuerpos de la invención

Ejemplo I - Aislamiento de anticuerpos neutralizantes del VIH-1 derivados de VH1-2 amplios y potentes a partir de un neutralizador élite infectado por el VIH-1

25

Se aislaron células B humanas reactivas a la proteína de la envoltura del VIH-1 de un individuo infectado con VIH-1 que previamente se identificó como con una actividad neutralizante sérica excepcional contra el VIH-1 en ensayos in vitro.

Para ello, se incubaron células B aisladas con proteína soluble VIH-1 Env etiquetada con fluorocromo (YU2_{gp140} o BG505_{SOSIP.664}) y se clasificaron unicelulares (Gieselmann et al., 2021, *supra*). Este enfoque permitió la amplificación posterior de segmentos génicos de anticuerpos pesados y ligeros de una célula B reactiva individual del VIH-1 Env mediante PCR. Esto permitió la clonación de los productos de PCR en vectores de expresión para la producción recombinante del anticuerpo correspondiente codificado por una célula B individual, permitiendo la prueba funcional del anticuerpo.

A partir del análisis de las secuencias de células B reactivas del VIH-1 Env, pudieron identificarse clones expandidos de células B derivadas de VH1-2. Uno de estos clones se caracterizó por una inserción de doce aminoácidos (aa) y una delección de un aminoácido en la región CDR1/FWR1 de cadena pesada. El anticuerpo 04_A06 es representativo de este clon de células B. Otro de estos clones, abarca una inserción 6 aa CDRH1/FWRH1 y una 4 aa FWRH3. El anticuerpo 01_D03 es un representante de este clon de células B.

Para determinar la potencia y amplitud neutralizantes generales, se ensayó el anticuerpo aislado 04_A06 así como otros anticuerpos para determinar la actividad neutralizante en el ensayo de neutralización de células TZM-bl contra un panel de referencia de 12 cepas de pseudovirus del VIH-1 que se conoce como “panel global” (**Figura 1**). Este panel de pseudovirus se diseñó previamente para ser una representación de la diversidad de la epidemia mundial de VIH-1 y permitir una evaluación estandarizada de la actividad de los anticuerpos neutralizantes.

Notablemente, todos los anticuerpos de la presente invención (es decir, 04_A06, 01_D03, 04_B09, 05_C07 y 01_B01) demostraron alta actividad neutralizante frente al 100 % (12/12) de las cepas incluidas en el panel (**Figura 1**).

La potencia neutralizante está representada rutinariamente por la concentración inhibidora de 50 % (IC₅₀). Cuando se probaron contra el “panel global”, todos los anticuerpos de la presente invención exhibieron una media geométrica IC₅₀ inferior a 0,05 µg/ml, en donde 04_A06 y 01_D03 fueron altamente activos con una media

geométrica IC_{50} de 0,038 $\mu\text{g/ml}$ o 0,021 $\mu\text{g/ml}$ contra las cepas de virus neutralizadas (**Figura 1**).

Ejemplo II - Alta potencia y amplitud del anticuerpo 04_A06

5 Para confirmar la potencia neutralizante y amplitud de 04_A06, el anticuerpo se probó contra un panel extendido de 119 pseudovirus VIH-1 como se probó previamente en Schoofs et al., 2019. Este panel de pseudovirus representa un desarrollo de un panel de pseudovirus descrito en detalle en Seaman et al., 2010. Proporciona una representación de la diversidad genética y global de las variantes del VIH-1 Env. Incluye variantes del VIH-1 de diferentes clados o
10 subtipos, que incluye variantes aisladas de virus transmitidos/fundadores y virus difíciles de neutralizar.

Notablemente, 04_A06 demostró alta potencia neutralizante y amplitud cuando se probó en el panel multiclado de 119 pseudovirus (**Figura 2**). En particular, cuando se probó a concentraciones de anticuerpos de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$, el anticuerpo 04_A06 neutralizó 99 % de
15 los pseudovirus probados y mostró una media geométrica IC_{50} de 0,036 $\mu\text{g/ml}$ contra los pseudovirus neutralizados (**Figura 2**). Esta amplitud y potencia son mayores que las observadas para otros anticuerpos neutralizantes del VIH-1 que también se dirigen al sitio de unión de CD4 y se encuentran en etapas avanzadas de pruebas clínicas (p. ej., 3BNC117, VRC01 y VRC07-523-LS) (**Figura 2**). Además, la potencia del anticuerpo 04_A06 en el panel
20 multiclado 119 fue mayor que la de N6, otro anticuerpo del sitio de unión de CD4 derivado de VH1-2 que actualmente se investiga en pruebas clínicas (**Figura 2**).

Además, cuando se comparó con otros anticuerpos neutralizantes del VIH-1 y otros bNAb CD4bs, para los cuales se disponía de resultados contra un total de 76 (**Figura 3 A**) y 99 (**Figura 3 B**) pseudovirus idénticos del VIH-1 (Yoon et al., 2015,*supra*), 04_A06 demostró
25 los niveles más altos de potencia y/o amplitud.

Ejemplo III - Alta potencia y amplitud del anticuerpo 04_A06 contra los pseudovirus del VIH-1 del clado C

Los virus VIH-1 del grupo M pueden dividirse en nueve clados y diferentes recombinantes. Los virus VIH-1 del clado C son responsables de aproximadamente la mitad de las infecciones actuales por VIH-1 y representan el linaje más común a nivel mundial. Por lo tanto, los virus del clado C se investigan en muchos estudios diferentes de anticuerpos y vacunas. Para confirmar la actividad antiviral del anticuerpo 04_A06 contra clados VIH-1 clínicamente relevantes, se determinó el perfil de neutralización del anticuerpo frente a un panel de referencia publicado, que consiste en 100 pseudovirus VIH-1 aislados de diferentes etapas de infección y virus difíciles de neutralizar. El llamado panel Subtipo C se describe detalladamente en Hraber et al., J Virol., 2017 Sep 12;91 (19):e00991-17.

Notablemente, 04_A06 demostró alta potencia neutralizante y amplitud cuando se probó contra el panel de pseudovirus del Subtipo C de 100 cepas (**Figura 4**). En particular, cuando se probó a concentraciones de anticuerpos de hasta 10 µg/ml, el anticuerpo 04_A06 neutralizó 99 % de los pseudovirus probados y mostró una media geométrica IC₅₀ de 0,057 µg/ml contra los pseudovirus neutralizados (**Figura 4**). La amplitud y potencia de 04_A06 es mayor que la observada para los mejores bNAb CD4bs investigados contra el panel de pseudovirus del Subtipo C hasta el momento (3BNC117, 1-18, N6, VRC01, VRC07-523-LS) (**Figura 4**). Los datos de neutralización para los bNAb de referencia CD4bs se obtuvieron de la base de datos CATNAP (Yoon et al., 2015, *supra*).

Ejemplo IV - Actividad neutralizante contra pseudovirus que están pobremente neutralizados por otros anticuerpos del sitio de unión de CD4

Aunque los anticuerpos del sitio de unión de CD4 pueden alcanzar altos niveles de amplitud neutralizante (es decir, tener actividad contra un gran número de variantes diferentes del VIH-1 Env), existen variantes del VIH-1 resistentes a anticuerpos. Por lo tanto, es importante

identificar nuevos anticuerpos del sitio de unión de CD4 que sean altamente activos contra dichas variantes del VIH-1.

Por lo tanto, determinamos el perfil de neutralización del anticuerpo 04_A06 descrito en esta invención contra un panel de nueve (**Figura 5**) y siete (**Figura 6**) variantes del VIH-1 que son resistentes a la neutralización por los bNAbs CD4bs.

Las cepas de virus ensayadas ilustradas en la **Figura 5** son constituyentes del panel multiclado de pseudovirus 119 y Subtipo C (como se describe en Schoofs et al., Immunity, 2019 Jun 18;50(6):1513-1529.e9, Hraber et al., J Virol., 2017 Sep 12;91 (19):e00991-17). Las cepas de virus ensayadas ilustradas en la **Figura 6** se seleccionaron de un panel de pseudovirus de referencia que se conoce como “Panel resistente a bNAbs CD4bs” y se describe en Zhou et al., PLoS Patog. 13 de junio de 2019;15(6):e1007819. Doi: 10.1371/journal.ppat.1007819. PMID: 31194843; PMCID: PMC6592578 12 de septiembre de 2017;91 (19):e00991-17.

En comparación con los anticuerpos del sitio de unión de CD4 en etapas avanzadas de pruebas clínicas y con los mejores bNAbs CD4bs publicados previamente en su clase (VRC07₋₅₂₃-LS, N6, 3BNC117, 1-18, VRC01), el anticuerpo 04_A06 neutraliza variantes de pseudovirus resistentes con amplitud y/o potencia mucho mayor (**Figura 5 y Figura 6**).

Por ejemplo, 100 % del panel de nueve pseudovirus y 86 % del panel de siete pseudovirus son neutralizados por 04_A06 cuando se probaron a concentraciones de hasta 10 µg/ml en el ensayo de neutralización de pseudovirus TZM-bl. En contraste, los bNAbs de referencia CD4bs más amplios y potentes descritos hasta el momento solo neutralizan entre 0 % - 67 % del panel de nueve pseudovirus (**Figura 5**) y 0 % - 57 % del panel de siete pseudovirus (**Figura 6**). Además, 04_A06 muestra la mayor potencia (IC₅₀ de 0,153 µg/ml) contra cepas del panel de siete pseudovirus en comparación con los bNAbs CD4bs de referencia (**Figura 6**).

Por lo tanto, los anticuerpos de esta invención proporcionan una solución a la pobre neutralización de virus que son resistentes a la neutralización por los bNAbs CD4bs.

Ejemplo V - Actividad neutralizante del anticuerpo 01_D03 contra pseudovirus que son insensibles a la neutralización por bNAb CD4bs

Además de las variantes de virus que son resistentes, también existen variantes que son insensibles a la neutralización por la mayoría de los bNAb CD4bs. Los ensayos clínicos han demostrado que la sensibilidad de las variantes del virus determina críticamente el éxito del tratamiento mediado por bNAb o estrategias de prevención. Los inventores investigaron el perfil de neutralización del anticuerpo 01_D03 contra un panel de virus que consiste en ocho cepas de pseudovirus (**Figura 7**) que se sabe que son insensibles a la neutralización por la mayoría de los bNAb CD4bs.

Las cepas virales de este panel son constituyentes del panel multiclado 119 de pseudovirus (como se describe en Schoofs et al., Immunity, 18 de junio de 2019;50(6):1513-1529.e9). La insensibilidad frente a la neutralización por un anticuerpo dado se definió por una $IC_{50} > 1 \mu g/ml$. El anticuerpo 01_D03 neutraliza 88 % (7/8) de las cepas virales del panel de ocho pseudovirus mientras que los bNAb de referencia más amplios y potentes contra CD4bs descritos hasta ahora solo neutralizan 25 % - 75 % (**Figura 7**). Por lo tanto, los anticuerpos de esta invención proporcionan una solución a la pobre neutralización de virus que son insensibles a la neutralización por la mayoría de los otros bNAb CD4bs.

Ejemplo VI - Actividad neutralizante frente a pseudovirus generados a partir de los ensayos de prevención mediados por anticuerpos

Los recientes ensayos de prevención mediada por antianticuerpos (AMP, por sus siglas en inglés) han proporcionado una prueba de concepto de que la administración de bNab puede, en principio, ser efectiva para prevenir infecciones por VIH-1 en humanos. En este ensayo, la eficacia de prevención de CD4bs bNab VRC01 dependió fuertemente de la sensibilidad de las cepas virales circulantes frente al anticuerpo. VRC01 mostró una eficacia de prevención de 75 % contra cepas de virus que fueron neutralizadas con una IC_{80} por debajo

de 1 µg/ml (como se describe en Corey L, Dos ensayos aleatorios de anticuerpos neutralizantes para prevenir la adquisición del VIH-1. N Engl J Med. 18 de marzo de 2021;384(11):1003-1014. Doi: 10.1056/NEJMoa2031738. PMID: 33730454; PMCID: PMC8189692).

- 5 El anticuerpo 04_A06 neutralizó hasta 98 % de 185 cepas de pseudovirus generadas a partir de las secuencias de virus obtenidas de los ensayos AMP (**Figura 8**). En contraste, VRC01 solo mostró una amplitud de hasta 83 % frente al panel de pseudovirus probado. Además, la media geométrica IC₅₀ (0,084 µg/ml) de 04_A06 contra el panel de virus fue aproximadamente 10 veces mayor que para VRC01 (0,839 µg/ml). Por lo tanto, 04_A06
- 10 puede considerarse como un candidato prometedor de bNab para futuras estrategias de prevención basadas en anticuerpos.

Ejemplo VII - Mantenimiento de la supresión viral mediante monoterapia de anticuerpos en un modelo in vivo de infección por VIH-1

- 15 Ratones humanizados infectados con VIH-1_{YU2} (Zhang et al., 2002, *supra*) proporcionan un modelo para estudiar la actividad antiviral de neutralizar anticuerpos contra el VIH-1 *in vivo*. Para generar ratones humanizados, los ratones NRG inmunodeficientes se irradian dentro de los primeros días después del nacimiento y se inyectan intrahepáticamente con células madre CD34⁺ hematopoyéticas humanas. Esto da como
- 20 resultado el desarrollo de linfocitos humanos que pueden infectarse con el VIH-1 competente para la replicación. Estos ratones pueden mantener niveles estables de viremia (es decir, números de copias de ARN del VIH-1 en plasma) y mostrar una tasa de diversificación de la secuencia del VIH-1 que es similar a lo que se observa en humanos (Klein et al., Nature. 6 de diciembre de 2012;492(7427):118-22. doi:
- 25 10.1038/nature1604). Este modelo de ratón se ha usado previamente para determinar la actividad antiviral de varios anticuerpos del sitio de unión de CD4 dados como monoterapia *in vivo* (179NC75: Freund et al., PLoS Pathog. 30 de octubre de 2015;11

(10):e1005238. doi: 10.1371/journal.ppat.1005238; 3BNC117: Horwitz et al, Proc Natl Acad Sci U S A.

8 de octubre de 2013;110(41):16538-43. doi: 10.1073/pnas.1315295110; 45-46^{G54W}: Klein et al, 2012, *supra*; NC37: Freund et al., Sci Transl Med. 2017 Jan 18;9(373):eaal2144. doi: 10.1126/scitranslmed.aal2144).

En todos estos estudios, solo se observaron efectos transitorios sobre la carga viral y se desarrolló rápidamente el rebote viral (es decir, retorno de viremia hacia niveles basales). Además, este rebote viral se asoció con el desarrollo de mutaciones en los sitios diana de anticuerpos. Por lo tanto, se requieren nuevos anticuerpos del sitio de unión de CD4 que sean capaces de mantener la supresión viral cuando se administra como monoterapia.

Cuando los ratones humanizados infectados por el VIH-1 YU2 se trataron con el anticuerpo del sitio de unión de CD4 VRC01 o VRC07 (dosis de carga de 1 mg por anticuerpo por vía subcutánea (s.c.), seguido de 0,5 mg dados s.c. cada 3-4 días), solo se observó una reducción transitoria del número de copias del ARN del VIH-1, y la viremia volvió a los niveles basales en la mayoría de los ratones dentro de 2-4 semanas (**Figura 9**). En contraste, cuando los ratones fueron tratados de acuerdo con el mismo esquema de dosificación con el anticuerpo representativo 04_A06 de la invención, se observó supresión viral en comparación con el número de copias virales al inicio del tratamiento en todos los ratones tratados durante un periodo de 84 días de tratamiento (**Figura 9**). En todos los ratones (100 %), el número de copias plasmáticas de ARN del VIH-1 se redujo a niveles por debajo del límite de precisión del ensayo usado (784 copias/ml).

Por lo tanto, 04_A06 es capaz de inducir y mantener eficazmente la supresión viral en ratones humanizados infectados por el VIH-1 YU2 incluso cuando se administra como monoterapia.

Ejemplo VIII - Mantenimiento de la supresión viral mediante monoterapia de anticuerpos en un modelo in vivo de infección por VIH-1 después del rebote viral de la terapia de clase VRC01

El fracaso de la monoterapia de anticuerpos usando anticuerpos del sitio de unión de CD4 en ratones humanizados infectados por el VIH-1 da como resultado un rebote viral y se asocia con resistencia viral contra el anticuerpo administrado (Freund et al., 2015, *supra*; Horwitz et al, 2013, *supra*; Klein et al, 2012, *supra*; Freund et al., 2017, *supra*). Por lo tanto, se requieren nuevos anticuerpos del sitio de unión de CD4 que proporcionen una opción de tratamiento *in vivo* después del fracaso previo de la terapia del sitio de unión de CD4.

Tras el rebote viral observado durante cuatro semanas de tratamiento con VRC01 (como se describe en el **Ejemplo VII**), la adición del anticuerpo 04_A06 de la invención al régimen de tratamiento (dosis de carga de 1 mg s.c. seguida de 0,5 mg administrada s.c. cada 3 días a 4 días) dio como resultado una reducción sostenida de viremia en todos (100 %) de los ratones tratados (**Figura 10**). Por lo tanto, el anticuerpo 04_A06 proporciona una opción para el control *in vivo* del VIH-1 incluso después del fracaso del pretratamiento con otros anticuerpos del sitio de unión de CD4.