



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL
DESARROLLO DE LA VACUNA PARA EL SIDA**

Autora: Lucía Alfonso González

Tutor: Luís Miguel Bedoya del Olmo

Convocatoria: Junio 2018

Índice

Resumen	3
Introducción	3
Ciclo del VIH	3
Sistema inmunitario y VIH	4
Mecanismos de escape virales.....	4
<i>Variabilidad genética</i>	4
<i>Enmascaramiento de los epítomos de neutralización</i>	5
<i>Latencia, persistencia y reactivación</i>	5
Tratamiento	5
Objetivos	6
Metodología	6
Resultados y discusión	6
Anticuerpos neutralizantes	6
<i>Anticuerpos frente al CD4bs</i>	7
<i>Anticuerpos frente a glucanos</i>	8
<i>Anticuerpos frente a V3</i>	9
<i>Anticuerpos frente a MPER</i>	9
<i>Anticuerpos frente a la conformación trimérica de gp120</i>	10
<i>Anticuerpos frente a CD4i</i>	11
Nuevas estrategias en la inmunización pasiva	11
<i>Combinación de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos</i>	11
Nuevas estrategias en la inmunización activa	12
<i>Enfoques reduccionistas para el diseño de antígenos</i>	12
<i>Diseño de antígenos mosaico</i>	12
<i>Antígenos basados en trímeros</i>	13
<i>Vacuna de linaje</i>	14
Ensayos en inmunización activa	15
Conclusiones	17
Bibliografía	17

Resumen

El SIDA se produce como consecuencia de la infección del VIH. La terapia antirretroviral actual, aunque es efectiva, no produce la curación de la enfermedad, debido a que el virus es capaz de permanecer latente y reactivarse. Por ello, el tratamiento debe mantenerse durante toda la vida del paciente. Se han desarrollado multitud de estrategias con el fin de conseguir la prevención, el mantenimiento de la remisión viral a largo plazo y la curación completa. Una de las líneas de investigación se centra en los anticuerpos ampliamente neutralizantes, capaces de actuar contra una amplia gama de cepas del VIH. Esta revisión bibliográfica analiza los principales anticuerpos neutralizantes investigados hasta la fecha y su relación con la inmunización activa y pasiva.

Introducción

El Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida o SIDA se produce cuando el organismo de una persona infectada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) no es capaz de ofrecer una respuesta inmune adecuada contra las infecciones. El VIH pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*. Se clasifica en VIH-1 y VIH-2. El VIH-2 se encuentra principalmente en zonas de África occidental, aunque se han detectado algunos casos en Europa y Estados Unidos. Presenta ocho subtipos: A, B, C, D, E, F, G, H [1]. El VIH-1 es el causante de la pandemia de SIDA a nivel mundial. Las cepas del VIH-1 se han clasificado en tres grandes grupos según su homología genética: el grupo M (*main* o principal), el grupo O (*outlier* o externo) y el grupo N (no M, no O). El grupo M se ha dividido en nueve subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K [2].

Ciclo del VIH

El ciclo comienza cuando el VIH se fusiona con la superficie de la célula hospedadora, dando lugar a la entrada de la cápside, que contiene el genoma vírico y las proteínas. La cubierta de la cápside se desintegra y una proteína del VIH, llamada transcriptasa inversa, transcribe el ARN viral a ADN. El ADN viral es transportado hasta el núcleo, donde la proteína integrasa del VIH integra el ADN del VIH en el ADN de la célula hospedadora. La maquinaria de la transcripción de la célula hospedadora transcribe el ADN del virus en múltiples copias de nuevo ARN vírico. Parte de este ARN se convierte en el genoma de un nuevo virus, mientras que la célula fabrica nuevas proteínas del VIH a partir de otras copias de ARN. El ARN y las proteínas se trasladan a la superficie de la célula, donde se forma un nuevo e inmaduro VIH.

Finalmente, el virus es liberado y la proteasa del VIH escinde las proteínas recién fabricadas para crear un virus infeccioso maduro [3].

Sistema inmunitario y VIH

El principal mecanismo de transmisión del VIH es a través de las relaciones sexuales, sean vaginales o anales. Las dianas principales del virus son las células que expresan la molécula CD4 en su superficie. Estas células son fundamentalmente los linfocitos T CD4, aunque los macrófagos y las células dendríticas también pueden verse involucrados. El virus alcanza estas células a través de las células dendríticas, que se encuentran en los epitelios y contienen receptores CD4 y correceptores CCR5, además de lectinas y otras moléculas que pueden ser también receptores virales. Una vez que el virus alcanza las células dendríticas, T CD4 y los macrófagos en las mucosas, se replica eficazmente.

Las células dendríticas en los tejidos linfoides presentan los antígenos de VIH a los linfocitos CD4 y a los linfocitos B vírgenes (*naive*). Los macrófagos infectados también presentan los antígenos del virus a los linfocitos B, para la formación de anticuerpos específicos. Las células dendríticas activan células *Natural Killer* (NK) y las células dendríticas plasmocitoides producen grandes cantidades de interferón tipo 1 y factor de necrosis tumoral, lo que contribuye a la proliferación de linfocitos CD8. Sin embargo, también producen quimioquinas que atraen más CD4, lo que contribuye a la diseminación de la infección.

La respuesta CD8 constituye el mecanismo más importante de protección frente al VIH. Su expansión clonal es marcada en estadios de primoinfección y en neutralizadores de élite, y su intensidad se correlaciona con el control de la replicación viral [4].

La incesante mutación del virus durante la enfermedad hace que los linfocitos T CD8 y B tengan que adaptarse continuamente a las nuevas cuasiespecies que se van generando [5].

Mecanismos de escape virales

Variabilidad genética.

La variabilidad del VIH se debe a la alta tasa de error de la transcriptasa inversa. Por un lado, se produce una alta proporción de virus defectivos y, por otro lado, se genera una gran diversidad en sus proteínas lo que le permite escapar de la respuesta inmune específica. También existen otros mecanismos de variabilidad, ya que el VIH-1, causante de la mayor parte de las infecciones, se divide en nueve subtipos distintos, que, en ocasiones, intercambian genes originando subtipos híbridos. Además, existen distintas variantes genéticas en cada subtipo.

Enmascaramiento de los epítomos de neutralización.

Este enmascaramiento se produce porque la envuelta viral en la superficie del virión es una estructura trimérica y su disposición oculta dominios conservados de neutralización, que solo quedan expuestos cuando se produce su unión al CD4. Por otro lado, también existen estructuras complejas de carbohidrato – escudos glicano – en los residuos de aminoácidos de los epítomos, que protegen del acceso de los anticuerpos [4].

Latencia, persistencia y reactivación.

Actualmente la erradicación del virus no es posible debido a la persistencia viral en las células diana, formando los denominados reservorios virales.

Tratamiento

Actualmente el tratamiento antirretroviral (TAR) consiste en la administración de una combinación de diferentes fármacos que permiten la supresión del virus en sangre (carga viral) e impiden su replicación. Sin embargo, aunque se trata de un tratamiento efectivo, no produce la curación de la enfermedad, ya que la integrasa viral permite la inserción del material genético del VIH en el genoma de la célula hospedadora, que pasa a formar parte del reservorio viral donde el VIH permanece latente e indetectable. Estas células no expresan proteínas virales que puedan ser reconocidas por el sistema inmunitario. Además, debido a que el virus latente no se replica, las células infectadas en latencia no pueden ser destruidas por el TAR, dado que estos fármacos actúan en distintas etapas de la replicación viral. De esta manera, si se detiene el TAR, los niveles del VIH en sangre repuntan gracias a las células del reservorio, por lo que el tratamiento debe mantenerse durante toda la vida del paciente. Con el fin de conseguir concentraciones indetectables del virus a largo plazo, se están desarrollando diferentes estrategias como la inmunización pasiva mediante anticuerpos neutralizantes (vacuna terapéutica) [3]. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la superficie del virus para evitar su entrada en las células diana. Fueron identificados por primera vez en un grupo de pacientes llamados “neutralizadores de élite” que producían anticuerpos capaces de neutralizar diferentes variantes virales. La administración de grandes cantidades de dichos anticuerpos a pacientes infectados impediría, por un lado, que los virus pudieran infectar nuevas células, lo que aumentaría el reservorio, empeorando el pronóstico de la enfermedad. Por otro lado, se unirían a las proteínas virales expresadas en la superficie de las células infectadas reactivadas, potenciando su destrucción por parte de células citotóxicas [4].

Otro enfoque consiste en la inmunización activa a través de la inducción de estos anticuerpos neutralizantes (vacuna preventiva). Se han diseñado algunas vacunas preventivas, pero, hasta el momento, solo una de ellas ha demostrado tener cierta eficacia (30% aproximadamente) en la protección frente al virus. Sin embargo, debido a la gran variabilidad del VIH y de los mecanismos de escape de los que dispone, es muy complejo desarrollar una vacuna preventiva [5].

Objetivos

Los objetivos propuestos en este estudio son los siguientes:

- Comprender las bases inmunológicas de la infección del VIH en relación con la terapia antirretroviral actual.
- Revisión de los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro más relevantes dirigidos contra la proteína de la envuelta del VIH.
- Revisión de las nuevas estrategias existentes en inmunización pasiva en relación con los anticuerpos ampliamente neutralizantes de la proteína de la envuelta del VIH.
- Revisión de las nuevas estrategias existentes en inmunización activa en relación con anticuerpos ampliamente neutralizantes de la proteína de la envuelta del VIH y ensayos clínicos realizados.

Metodología

En este estudio se ha realizado una revisión bibliográfica guiada y tutorizada. Los conceptos y generalidades se han obtenido de libros especializados en la materia, páginas web de referencia, como el *National Institute of Health* (NIH) del *Department of Health and Human Services* de Estados Unidos, y diversas revisiones bibliográficas. La información más específica proviene de publicaciones y artículos disponibles en diferentes bases de datos, tales como MEDLINE, a través de PubMed, SciELO y ScienceDirect; y de revistas científicas, como *Nature*, *Journal of Virology* o *Immunity*.

Resultados y discusión

Anticuerpos neutralizantes

Los primeros anticuerpos sintetizados tras la infección son los anticuerpos neutralizantes autólogos (específicos de cada cepa) (NAbs, del inglés *Neutralizing Antibodies*), que generan una presión inmune responsable de la generación de mutaciones de escape virales. Más tarde,

en algunos casos, se originan los llamados *anticuerpos ampliamente neutralizantes* (bNAbs, del inglés *Broadly Neutralizing Antibodies*), que tienen actividad neutralizante frente a una amplia gama de cepas del VIH extracelulares y asociadas a células [6].

Los anticuerpos neutralizantes pueden interactuar con la envoltura vírica e impedir su unión a los receptores CD4 de los linfocitos T CD4 y también pueden unirse a las proteínas virales que se expresan en la superficie de las células infectadas con replicación viral activa. Una vez unidos a las células infectadas, pueden ser reconocidos por células citotóxicas, como las células NK, que inducirán a las células infectadas a la apoptosis [5] (Figura 1).

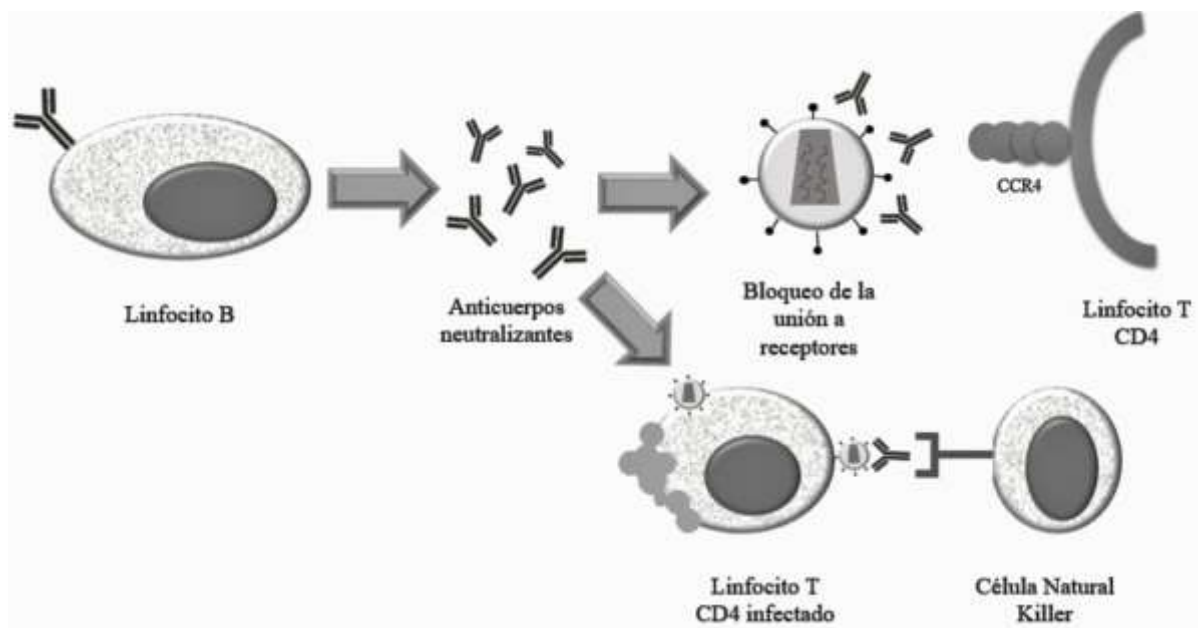


Figura 1: Representación esquemática de las interacciones de anticuerpos neutralizantes con el VIH.

Se han descrito numerosos anticuerpos policlonales y monoclonales, la mayoría dirigidos contra la proteína de la envuelta (*env*), formada por la glicoproteína 41 (gp41) y la 120 (gp120) (Figura 2). La unión entre la gp120 y el CD4 genera cambios conformacionales que facilitan la interacción con los correceptores (CCR5 y CXCR4), cuya unión permite la disociación de gp120 y gp41 y la exposición del péptido de fusión, que posibilita la unión de la membrana vírica y la membrana de la célula hospedadora [7].

Anticuerpos frente al CD4bs

b12

La inmunoglobulina G b12 (IgG b12) actúa en el dominio de unión del virus con el receptor CD4 (CD4bs) en gp120 viral. El CD4bs es un dominio altamente conservado y es el causante de la interacción entre la envoltura del virus y la molécula CD4 en la superficie de las células

diana [7]. La IgG b12 contiene una larga cadena en la región determinante de complementariedad 3 (CDR H3), que le permite entrar en el hueco que forma el CD4bs en la gp120 [8]. En un ensayo *in vitro* en el que utilizaron 93 virus de diferentes tipos, b12 fue capaz de neutralizar el 50% de los diferentes subtipos virales [9]. *In vivo*, administrado por vía intravenosa, fue capaz de proteger de forma dosis-dependiente de la infección del Virus de la Inmunodeficiencia Simia/Humana (VISH) en un ensayo en macacos [10]. Sin embargo, este anticuerpo es excepcional en la especie humana, por lo que es poco probable que se pueda inducir [11].

HJ16

El anticuerpo neutralizante HJ16 también se une a CD4bs, aunque a un epítipo diferente. Tiene una reactividad similar a b12, pero la especificidad es distinta, si bien también es capaz de neutralizar virus de diferentes subtipos [12].

VRC01 y VRC02

Son variantes somáticas del mismo clon de Ig G1. En un estudio realizado por Wu X et al. VRC01 y VRC02 neutralizaron más del 90% de los aislados de VIH circulantes [13]. Esta amplitud de reactividad puede explicarse porque imitan parcialmente la interacción del receptor CD4 con gp120.

Aunque la región CD4bs se considera conservada, Wu X et al. mostró que el anticuerpo VRC01 ejerce presión de selección sobre el gen *env* de VIH-1, que evoluciona para escapar de la neutralización. Sin embargo, la respuesta de las células B también evoluciona al generar anticuerpos contra los mutantes de escape víricos [14].

VRC07-523LS, una variante de VRC01, 10 veces más potente y activa frente al 96% de las cepas de VIH, incluido el subtipo C, está siendo segura y bien tolerada según los últimos resultados del ensayo clínico de fase I realizado por Houser KV et al. Además, las concentraciones séricas cuatro semanas después de la infusión fueron 4 veces superiores a los niveles de VRC01 de los estudios previos [15].

Anticuerpos frente a glucanos

2G12

La envuelta del VIH está fuertemente glucosilada, de manera que se forman “escudos glucano”, que dificultan el acceso de los anticuerpos dirigidos frente a la envuelta. No

obstante, 2G12 puede superar esta estrategia de enmascaramiento, uniéndose a un grupo de oligomanosas en la envoltura de glucoproteínas.

El tratamiento con 2G12 bloqueó la interacción, a través del CD4, de la sinapsis de células dendríticas y células T, quedando retenidos los viriones en las células dendríticas [16]. Además, 2G12 puede neutralizar un número significativo de aislados pertenecientes al subtipo B, siendo menos efectivo en el resto de los subtipos, sobre todo en el caso del subtipo C [8]. En experimentos de inmunización pasiva, 2G12 proporcionó protección en macacos contra la infección por VISH [17] y esta protección fue mayor cuando se administró en combinación con otros anticuerpos monoclonales (mAbs, del inglés *monoclonal antibodies*).

Anticuerpos frente a V3

447-52D

El mAb (*monoclonal antibody*) 447-52D reconoce la región V3 de gp120 y para su unión requiere el epítipo de la secuencia tetrapeptídica fuertemente conservada, GPGR, que se encuentra en el centro del dominio V3. GPGR se une al fragmento de unión al antígeno (Fab) y el extremo N-terminal de V3 interactúa a través de enlaces de hidrógeno con la cadena CDR H3 del anticuerpo. La presencia de N-glucanos adyacentes a V3 puede interferir con la unión del anticuerpo [8]. En ensayos *in vitro*, 447-52D neutralizó predominantemente virus del subtipo B, ya que GPGR se encuentra fundamentalmente en virus de este subtipo [18].

F425-B4e8

El mAb F425-B4e8 reconoce una conformación de la región V3 y neutraliza diferentes aislados de los subtipos B, C y D [19].

HGN194

HGN194 es un mAb que se une a un epítipo conservado de la región V3. En un ensayo *in vitro* realizado por Corti D et al. neutralizó todos los virus de tipo 1 analizados y una alta proporción del tipo 2, independientemente del subtipo [12].

Anticuerpos frente a MPER

2F5

2F5 se une a la región de la membrana proximal externa (MPER) de la subunidad gp41 de la glicoproteína *env*. Aunque neutraliza una gran variedad de virus de diferentes subtipos,

muestra una baja actividad neutralizante frente al subtipo C. Un estudio realizado en macacos mostró protección frente al VISH tras su inmunización pasiva con 2F5 [20].

4E10

Reconoce un epítipo ubicado en el extremo C-terminal de MPER. Además, sus residuos hidrofóbicos en CDR H3 median una unión reversible a la membrana viral, lo que es esencial para su actividad neutralizante. 4E10 muestra una notable amplitud de reactividad, pudiendo proporcionar protección completa frente al VISH en macacos [20].

Asimismo, la inmunización pasiva con 2G12, 2F5 y 4E10 en individuos infectados por VIH que habían interrumpido el TAR, retrasó, pero no evitó, el rebrote virológico [21, 22].

Z13

El epítipo que reconoce se encuentra entre los de 2F5 y 4E10, si bien su capacidad de neutralización es menor. Tras una serie de mutaciones aleatorias en la región determinante de complementariedad (CDR) en Fab, se seleccionó una variante de alta afinidad, Z13e1, con una afinidad de unión a MPER 100 veces mayor que el Fab parental y mayor potencia de neutralización contra VIH-1 sensible, aunque todavía inferior a la de 2F5 y 4E10 [23].

10E8

Se dirige frente a un epítipo situado en MPER. Se han seguido dos estrategias para aumentar su potencia de neutralización: la optimización de su función y estabilidad mediante mutagénesis; y la promoción de la polivalencia mediante ingeniería de anticuerpos.

Siguiendo la primera estrategia, recientes estudios han permitido el aumento de la potencia de neutralización mediante el aumento de la carga positiva en la superficie del paratopo, lo que fortalece la interacción electrostática entre el anticuerpo y la superficie del virus [24, 25].

En cuanto a la segunda estrategia, los trabajos publicados describen anticuerpos que interactúan simultáneamente con dos determinantes *env* independientes (bivalentes) o tres (trivalentes) [26].

Anticuerpos frente a la conformación trimérica de gp120

PG9 y PG16

PG9 y PG16 se unen a un epítipo situado en la región externa de la gp120 en su forma trimérica, que tiene un alto grado de conservación [11], lo que permitió la neutralización del 60% de los aislados virales [27].

Anticuerpos frente a CD4i

Los anticuerpos anti CD4i reconocen epítomos en el sitio de unión de los correceptores, que quedan expuestos tras la unión de gp120 al CD4, antes de su interacción con el correceptor. Los anticuerpos anti CD4i, como 17b, 48d o X5, muestran una actividad neutralizante débil frente a la mayoría de los aislados de VIH-1 [28], lo que se debe a factores estéricos que limitan su acceso al sitio de unión del correceptor.

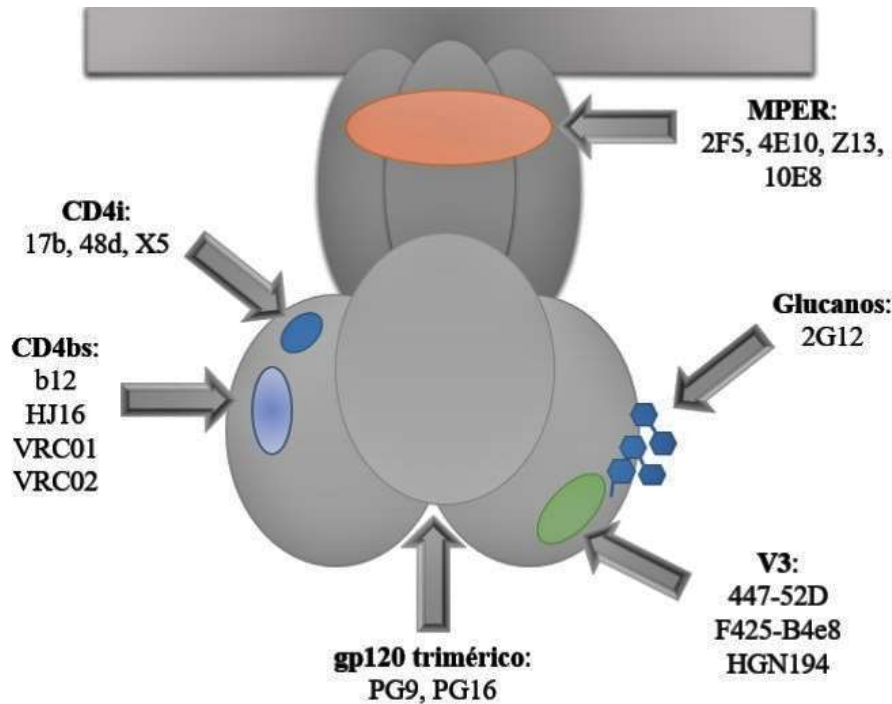


Figura 2: Dianas en env de anticuerpos ampliamente neutralizantes.

Nuevas estrategias en la inmunización pasiva

Una de las estrategias para activar el sistema inmune frente al virus consiste en la administración de grandes cantidades de anticuerpos neutralizantes a pacientes infectados (vacuna terapéutica), con el fin de bloquear viriones y promover la destrucción de células infectadas reactivadas, uniéndose a las proteínas virales expresadas en su superficie [4].

Combinación de anticuerpos y anticuerpos multispecíficos

Debido a la gran diversidad de cepas circulantes de VIH-1, el uso de un solo bNAb podría conducir al desarrollo y selección de cepas resistentes. Por lo que se puede recurrir a una combinación de dos o más bNAbs, tanto para lograr una terapia eficaz contra el VIH como para cubrir diversas cepas en inmunoprolifaxis [29]. En ratones humanizados la combinación de bNAbs condujo al control de la viremia durante un promedio de 60 días tras el cese del TAR [30].

Otra estrategia se basa en el diseño de anticuerpos multiespecíficos, en los que una sola molécula interactúa con varios epítomos. Pegu et al. diseñaron anticuerpos trispecíficos capaces de unirse a tres determinantes antigénicos independientes de la envoltura del VIH: CD4bs, MPER y el sitio de unión a glucano V1V2. Estos anticuerpos mostraron mayor potencia y amplitud que los bNAbs individuales descritos previamente, una farmacocinética similar a la de los bNAbs humanos y confirieron inmunidad completa frente al VIH en modelos de primates no humanos (NHP) [29].

Nuevas estrategias en la inmunización activa

Ya que los bNAbs aseguraron una protección eficiente contra la infección experimental del virus en primates no humanos y ratones que portaban genes funcionales del sistema inmune humano [31, 32], la inducción de estos anticuerpos es el principal objetivo en el desarrollo de vacunas contra el VIH, si bien los mecanismos de su generación no se conocen del todo. La inducción de anticuerpos ampliamente neutralizantes se demostró teóricamente y se volvió alcanzable estos últimos años [33].

En un principio, se pensó que la persistencia prolongada del antígeno era necesaria para estimular la maduración de la afinidad de los anticuerpos y la inducción de bNAbs. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que su inducción puede ocurrir en la infección temprana [34], por lo que la inducción eficiente de bNAbs a través de la vacunación es posible.

Enfoques reduccionistas para el diseño de antígenos

Se basa en la identificación del epítomo de un anticuerpo neutralizante en el antígeno compuesto, para luego reproducir dicho epítomo en su formato mínimo. Debido a que la mayoría de epítomos son conformacionales, es decir, dependen de la estructura tridimensional del antígeno inicial, su síntesis es difícil [35]. No obstante, actualmente se usan sistemas *in silico* – por vía computacional – para restringir la búsqueda de epítomos, dando lugar a coincidencias estructurales casi perfectas, como es el caso de los epítomos de 2F5 [36], 4E10 [37], IgG b12 [38], lo que aumenta el optimismo en lo referente a la búsqueda de un antígeno vacuna viable.

Diseño de antígenos mosaico

Esta estrategia pretende hacer frente a la variabilidad del virus mediante secuencias génicas que codifican partes de una proteína que puede ser reconocida por las células T. Estas secuencias se seleccionan con ayuda de algoritmos, que comparan un gran número de

secuencias virales de diferentes variantes del VIH, que se criban posteriormente para generar una secuencia compuesta de ADN, representativa de todas las secuencias muestreadas. Tras su optimización, con el fin de obtener aquellos péptidos capaces de generar una respuesta inmunitaria, se unen entre sí para generar un gen que codifique a una proteína completa que actúe como antígeno [35]. Estos genes se introducen en los vectores adecuados para su expresión posterior. Diversos estudios en modelos NHP han demostrado su potencial [39, 40, 41].

Antígenos basados en trímeros

Se ha planteado el uso del trímero *env* como antígeno, ya que es el objetivo de la mayoría de los anticuerpos neutralizantes. Los trímeros de la proteína *env* tienen mejores características estructurales en comparación con las construcciones monoméricas basadas en gp120, ya que los epítomos están estéricamente limitados por detalles estructurales que protegen de la unión inespecífica con anticuerpos. Este es el caso de cycp-gp120, una proteína trimérica que, en estudios recientes en conejos y macacos, genera bNAbs dirigidos frente a la región V1V2, respuesta que no se consigue en inmunizaciones con gp120 monomérica [42].

La estabilidad del trímero es esencial, particularmente en las interacciones no covalentes entre las subunidades gp120 y gp41. Se han usado diversas estrategias de inmunización con el fin de generar proteínas gp140 solubles, que incluyen gp120 y el ectodominio gp41 (gp41ECTO). Una de ellas dio lugar al trímero SOSIP, en el que estas subunidades se escindían proteolíticamente y, cuyo intento de superar la inestabilidad resultante, dio lugar a BG505 SOSIP.664, que se basó en la introducción de un enlace disulfuro intermolecular para fortalecer la interacción gp120-gp41ECTO y una mutación en gp41[43]. En estudios de inmunización en conejos por vía intramuscular, los trímeros estabilizados indujeron anticuerpos neutralizantes contra virus autólogos. Los macacos también respondieron aunque de manera más débil [44]. Sin embargo, en un estudio más reciente, también en macacos, se concluye que la inmunización por vía subcutánea induce respuestas NAb más fuertes que la inmunización por vía intramuscular [45]. Por otro lado, Burton DR et al. realizaron un estudio en el que la inmunización de cuatro vacas con BG505 SOSIP dio como resultado la inducción de bNAbs. Uno de los animales produjo anticuerpos que a los 42 días eran capaces de bloquear el 20% de los 117 subtipos del VIH analizados y a los 381 días, el 96% [46].

Los trímeros de unión flexible (NFL) y de cadena única (SC) constituyen otros enfoques alternativos. Ambos se basan en un enlazador flexible que facilita la asociación correcta entre gp120 y gp41ECTO, sin la necesidad de escisión proteolítica, como ocurre en el caso de

SOSIP.664. En macacos rhesus los trímeros NFL inducen respuestas equivalentes, pero más lentas que los trímeros SOSIP [45].

Otra estrategia se basa en los trímeros de la proteína *env* modificados expuestos en partículas pseudovíricas (VLPs, del inglés *virus-like particles*), que presentan diversas ventajas frente a las proteínas *env* solubles y tienen propiedades únicas: modulan la exposición de los sitios de unión del receptor CD4 y del correceptor; crean restricciones estéricas para el contacto con bNAbs; aumentan la densidad de presentación de *env*, mejorando la respuesta inmune; forman trímeros estables que no inducen respuestas inmunitarias inespecíficas; y permiten la adición de moléculas inmunoestimulantes. Además, la inmunización utilizando un régimen de tipo inducción-refuerzo (con una primera dosis sensibilizante y una segunda dosis que actúa como refuerzo) heterólogo con la *env* trimérica modificada es capaz de inducir la formación de bNAbs [6].

Vacuna de linaje

Se utilizan secuencias del gen *env* de sujetos infectados por VIH que desarrollan respuestas de bNAb (*linajes naturales*), con el fin de simular la formación de estos anticuerpos. Otra estrategia alternativa, se basa en el diseño de inmunógenos de *env* para que los anticuerpos se dirijan a un epítipo particular (*linajes diseñados*), de manera que se desencadena una vía de desarrollo de bNAb específica. Estas estrategias no son mutuamente excluyentes.

La primera etapa de la respuesta bNAb implica la expresión por parte de las células B vírgenes de un precursor de bNAb de la línea germinal sin ninguna mutación. Con el fin de activar la línea germinal correcta, se han realizado diversos intentos basados en el monómero de gp120, como el dominio externo modificado por ingeniería genética (eOD) o las proteínas del núcleo de gp120 (core-gp120), ambos se centran en la familia de los bNAbs de CD4bs. Otro enfoque, se centra en el diseño de trímeros de *env*, como SOSIP, para activar múltiples líneas germinales de bNAbs [6]. Se realizaron estudios inmunológicos para examinar su uso, junto con una inmunización refuerzo posterior con uno o más trímeros SOSIP “maduros”. Se obtuvieron resultados prometedores mediante el uso de BG505 SOSIP.664 y otros trímeros en modelos de ratón *knock-in* [47]. Estos estudios demuestran la necesidad de inmunógenos específicos que se dirijan a las células B en las diferentes etapas de la evolución de la respuesta neutralizantes anti-VIH-1 y respaldan la idea de que la vacunación para el VIH-1 requerirá una estrategia que implique la inmunización secuencial con diferentes antígenos.

Ensayos en inmunización activa

El primer ensayo se realizó en 1993 en China con una vacuna de péptidos sintéticos del anillo V3 de la gp120, seguido en 1994 de otros dos ensayos con la misma vacuna en Brasil y Tailandia. Entre 1995 y 2000 se efectuaron otros ensayos en Tailandia de vacunas de la envoltura con gp120, procedentes de los subtipos B y E del VIH, uno de los cuales entró en evaluación en un ensayo de fase III en 1999. Por otro lado, en 1996 se iniciaron ensayos de fases I y II con una vacuna V3 [48].

Sin embargo, no se obtuvo ningún resultado de eficacia aceptable hasta 2009 con el ensayo RV144, efectuado en Tailandia y que involucró a más de dieciséis mil sujetos adultos. El estudio evaluó dos vacunas, una vacuna principal, que se inyectó primero, y una de refuerzo, que se inyectó dos semanas después. La vacuna principal fue ALVAC-HIV, que utilizaba el virus de la viruela del canario como vector para suministrar los genes *env* (subtipo E/B), *gag* y *pol* (subtipo B), que codifican para la envuelta, la retrotranscriptasa y la integrasa del virus respectivamente. La vacuna de refuerzo era AIDSVAX B/E, que contenía la proteína de la envuelta gp120, con alumbre como coadyuvante. El ensayo mostró una eficacia del 31,2%, que se asoció con la producción de anticuerpos protectores no neutralizantes dirigidos contra la región V1V2 de la gp120. Dicha eficacia, si bien supuso un logro sin precedentes en aquel momento, no es comparable con la alta eficacia que proporcionan la mayoría de las vacunas en otras enfermedades (superior al 90%). La utilidad de estas vacunas parcialmente protectoras en poblaciones con altas tasas de prevalencia del VIH es aún una incógnita [6].

Se han realizado otros ensayos de vacunas preventivas basadas en diversas estrategias que han resultado ser ineficaces. Los ensayos Step (en Estados Unidos) y Phambili (en Sudáfrica) evaluaron la vacuna trivalente *gag/pol/nef* de subtipo B con Adenovirus tipo 5 (Ad5) como vector. El ensayo Step terminó prematuramente en 2007 por falta de eficacia, ya que la vacuna no prevenía la infección o el impacto de la viremia temprana, a pesar de que inducía respuestas de células T de magnitud y amplitud similar a las observadas en ensayos anteriores. Además, la seguridad del vector Ad5 fue puesta en entredicho, debido a la tendencia no significativa hacia un mayor riesgo de infección por VIH-1 en vacunados con NAb's específicos de Ad5 preexistentes, por ello, se suspendieron otros ensayos que utilizaban Ad5 como vector, incluyendo Phambili y el ensayo VRC IIB HVTN 505. Análisis posteriores de los participantes de Step indicaron que dicho aumento se debió en gran medida a que los hombres no habían sido circuncidados y/o presentaban inmunidad humoral específica a Ad5

preexistentes. Por ello el ensayo VRC se redujo para inscribir solo participantes masculinos circuncidados sin NAbs detectables de Ad5 [49].

Ensayo	Fase	Vacuna candidata	Subtipo	Resultado
VAX 003	III	Proteína gp120 en alumbre	B/E	Ineficaz
VAX 004	III	Proteína gp120 en alumbre	B/B	Ineficaz
RV144	III	ALVAC <i>gag/pol/env</i> - AIDVAX gp120 con alumbre.	B/E	31,2% de eficacia
HVTN 502 (Step)	IIb	Ad5 <i>gag/pol/nef</i>	B	Ineficaz
HVTN 503 (Phambili)	IIb	Ad5 <i>gag/pol/nef</i>	B	Ineficaz
HVTN505 (VRC)	IIb	ADN - <i>gag/pol/env</i>	A/B/C	Ineficaz

Tabla 1: Resumen de los ensayos finalizados de fase IIb/III de la vacuna preventiva del VIH.

Se han realizado otros ensayos basados en RV144, como el HVTN 097, de fase I, que evaluó el régimen utilizado en RV144 en sudafricanos [50]; y HVTN 100, de fase I/II, también en sudafricanos, pero con el subtipo C y con vacunación de refuerzo al cabo del año para prolongar el efecto protector. Ambos obtuvieron resultados similares al RV144. A raíz de los resultados del HVTN 100, se puso en marcha en 2016 el HVTN 702, un estudio de fase IIb/III que pretende evaluar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de ALVAC-HIV + gp120 del subtipo C con MF59 de adyuvante, en mujeres y hombres sudafricanos de entre 18 y 35 años. Los resultados se esperan para finales del 2020 [51].

Otra estrategia de vacunación preventiva ha sido evaluada recientemente en el ensayo de fase I/IIa APPROACH, que ha sido bien tolerado. Compara dos regímenes distintos de vacunación. La vacuna principal, conocida como Ad26.Mos.HIV, utiliza el Adenovirus del serotipo 26 como vector de los antígenos mosaico *gag/pol/env*. La vacuna de refuerzo podía ser Ad26.Mos4.HIV junto con la proteína trimérica gp140 subtipo C soluble con alumbre como coadyuvante sola o en combinación con antígenos mosaico [52]. Por otro lado, el ensayo de fase I/II TRAVERSE compara los regímenes basados en Ad26 con tres y cuatro antígenos mosaico, Ad26.Mos.HIV trivalente y tetravalente [51, 53, 54]. Los resultados iniciales muestran que ambos regímenes son bien tolerados y pueden provocar respuestas inmunitarias contra el VIH. Dados los resultados, son necesarios estudios a mayor escala con el fin de evaluar la eficacia.

Conclusiones

Tras la revisión bibliográfica realizada se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Los fenómenos de latencia, persistencia y reactivación impiden la curación completa mediante la terapia antirretroviral actual.
- Existe una alta diversidad de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro dirigidos frente a la proteína de la envuelta del VIH capaces de impedir la infección de células diana e inducir las células infectadas a la apoptosis.
- La administración de anticuerpos neutralizantes en pacientes infectados podría ser una estrategia efectiva para conseguir concentraciones indetectables del virus en sangre a largo plazo.
- La inducción de anticuerpos neutralizantes mediante inmunización activa es una estrategia ampliamente estudiada en la actualidad, aunque es necesario continuar desarrollándola, ya que hasta ahora los ensayos de eficacia no han sido satisfactorios.

Bibliografía

- [1] Rivas P, Holguín A, Ramírez E, Muñoz-Almagro C, Delgado R et al. Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2006; 24(2): 29-33.
- [2] Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 29:58-65. Doi: 10.1016/j.eimc.2010.10.00.
- [3] National Institute of Allergy and Infectious Diseases [Sede Web] [actualizado 23 de mayo de 2017; consultado 25 de enero de 2018]. Disponible en: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>.
- [4] Alcamí J. Vacunas frente al virus de la inmunodeficiencia humana/SIDA. *FarmaJournal*. 2016; 1 (2): 189-195.
- [5] Amo J, Coiras T, Díaz A, Pérez MA. VIH: La investigación contra la gran epidemia del siglo XX. 1ª Ed. Madrid: Catarata; Instituto de Salud Carlos III; 2017. P. 96-108.
- [6] Vzorov AN, Uryvaev LV. Requirements for the Induction of Broadly Neutralizing Antibodies against HIV-1 by Vaccination. *Molecular Biology*. 2017; 51(6): 819-829. Doi: 10.1134/S0026893317060176.
- [7] Granados-González V, Piedrahita LD, Matínez M, Genin C, Riffard S, Urcuqui-Inchima S. Papel del dominio V1/V2 de la glucoproteína 120 del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 en la inducción de anticuerpos neutralizantes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009; 27(9):523-530. Doi:10.1016/j.eimc.2008.02.010.
- [8] González N, Álvarez A, Alcamí J. Broadly Neutralizing Antibodies and their Significance for HIV-1 Vaccines. *Current HIV Research*. 2010; 8: 602-612.
- [9] Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M et al. Comprehensive Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. *Journal of Virology*. 2004; 78(23):13232-13252. Doi: 10.1128/JVI.78.23.13232-13252.2004.
- [10] Parren PWHI, Marx PA, Hessel AJ, Luckay A, Harouse J et al. Antibody Protects Macaques against Vaginal Challenge with a Pathogenic R5 Simian/Human Immunodeficiency

- Virus at Serum Levels Giving Complete Neutralization In Vitro. *Journal of Virology*. 2001; 75 (17): 8340-8347. Doi: 10.1128/JVI.75.17.8340-8347.2001.
- [11] Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 29: 216-226. Doi: 10.1016/j.eimc.2011.01.006.
- [12] Corti D, Langedijk JPM, Hinz A, Seaman MS, Vanzetta F et al. Analysis of Memory B Cell Responses and Isolation of Novel Monoclonal Antibodies with Neutralizing Breadth from HIV-1-Infected Individuals. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8805.
- [13] Wu X, Yang Z-Y, Li Y, Hogerkorp C-M, Schief WR et al. Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1. *Science*. 2010; 329 (5993): 856-881. Doi: 10.1126/science.1187659.
- [14] Wu X, Wang C, O'Dell S, Li Y, Keele BF et al. Selection Pressure on HIV-1 Envelope by Broadly Neutralizing Antibodies to the Conserved CD4-Binding Site. *Journal Virology*. 2012; 86(10): 5844-5856. Doi: 10.1128/JVI.07139-11.
- [15] Gaudinski MR, Houser KV, Chen G, Rothwell RS, Costner P et al. A phase I dose-escalation study of monoclonal antibody VRC07-523LS in healthy adults [Sede Web]. USA: CROI; 2018 [consultado 5 mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.croiconference.org/sessions/phase-i-dose-escalation-study-monoclonal-antibody-vrc07-523ls-healthy-adults>.
- [16] Felts RL, Narayan K, Estes JD et al. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 13336-13341.
- [17] Hessel AJ, Rakasz EG, Pognard P, et al. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titres. *PLoS Pathog*. 2009; 5: e1000433.
- [18] Binely JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Burton DR. Comprehensive Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. *Journal of Virology*. 2004; 78(23):13232-13252. Doi: 10.1128/JVI.78.23.13232-13252.2004.
- [19] Pantophlet R, Aguilar-Sino RO, Wrin T, Cavacini LA, Burton DR. Analysis of the neutralization breadth of the anti-V3 antibody F425-B4e8 and re-assessment of its epitope fine specificity by scanning mutagenesis. *Virology*. 2007; 364: 441-53.
- [20] Hessel AJ, Rakasz EG, Tehrani DM, Burton DR. Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *Journal of Virology*. 2010; 84: 1302-13.
- [21] Mehandru S, Vcelar B, Wrin T, et al. Adjunctive passive immunotherapy in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals treated with antiviral therapy during acute and early infection. *Journal of Virology*. 2007; 81: 11016-31.
- [22] Trkola A, Kuster H, Rusert P, et al. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nature Medicine*. 2005; 11: 615-22.
- [23] Nelson JD, Brunel FM, Jensen R, Crooks ET, Cardoso RMF et al. An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10. *Journal of Virology*. 2007; 81: 4033-4043. Doi: 10.1128/JVI.02588-06.
- [24] Rujas E, Leaman DP, Insausti S, Ortigosa-Pascual L, Zhang L et al. Functional optimization of Broadly Neutralizing HIV-1 Antibody 10E8 by promoting membrane interactions. *Journal of Virology*. 2018. Doi: 10.1128/JVI.02249-17.

- [25] Kwon YD, Chuang GY, Zhang B, Bailer RT, Doria-Rose NA et al. Surface-Matrix Screening Identifies Semi-specific Interactions that Improve Potency of a Near Pan-reactive HIV-1 Neutralizing Antibody. *Cell Reports*. 2018; 22: 1798-1809.
- [26] Montefiori DC. Bispecific Antibodies Against HIV. *Cell*. 2016; 165(7) 1563-1564. Doi: 10.1016/j.cell.2016.06.004.
- [27] Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV infected individuals. *Nature*. 2009; 458: 636-640. Doi: 10.1038/nature07930.
- [28] Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X et al. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99: 6913-6918.
- [29] Xu L, Pegu A, Rao E, Doria-Rose N, Beninga J et al. Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques. *Science*. 2017; 358(6359):85-90. Doi: 10.1126/science.aan8630.
- [30] Klein F, Halper-Stromberg A, Horwitz JA, Gruell H, Scheid JF et al. HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature*. 2012; 492(7427): 118-122. Doi: 10.1038/nature11604.
- [31] Klein K, Veazey RS, Warrier R et al. Neutralizing IgG at the portal of infection mediates protection against vaginal simian/human immunodeficiency virus challenge. *Journal of Virology*. 2013; 87:11604–11616.
- [32] Veselinovic M, Neff CP, Mulder LR, et al. Topical gel formulation of broadly neutralizing antiHIV-1 monoclonal antibody VRC01 confers protection against HIV-1 vaginal challenge in a humanized mouse model. *Virology*. 2012; 432: 505–510.
- [33] Burton DR, Ahmed R, Barouch DH, et al. A blueprint for HIV vaccine discovery. *Cell Host Microbe*. 2012. 12: 396–407.
- [34] Goo L, Chohan V, Nduti R, Overbaugh J. Early development of a broad neutralizing antibodies in HIV-1 infected infants. *Nature Medicine*. 2014; 20(6): 655-658. Doi: 10.1038/nm.3565.
- [35] Schiffner T, Sattentau QJ, Dorrel L. Development of prophylactic vaccines against HIV-1. *Retrovirology*. 2013; 10(72). Doi: 10.1186/1742-4690-10-72.
- [36] Ofek G, Guenaga FJ, Schief WR, Skinner J, Baker D et al. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 2010; 107(42): 17880–17887.
- [37] Correia BE, Ban YE, Friend DJ, Ellingson K, Xu H et al. Computational protein design using flexible backbone remodeling and resurfacing: case studies in structure-based antigen design. *Journal of Molecular Biology*. 2011; 405(1):284–297.
- [38] Azotei ML, Correia BE, Ban YE, Carrico C, Kalyuzhniy O et al. Computation-guided backbone grafting of a discontinuous motif onto a protein scaffold. *Science*. 2011; 334(6054): 373-376. Doi: 10.1126/science.1209368.
- [39] Barouch DH, O'Brien KL, Simmons NL, Abbink P, Maxfield LF et al. Mosaic HIV-1 vaccines expands the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nature Medicine*. 2010; 13: 319-323. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2089>.
- [40] Santra S, Liao HX, Zhang R, Muldoon M, Watson S et al. Mosaic vaccines elicit CD8+ T lymphocyte responses that confer enhanced immune coverage of diverse HIV strains in monkeys. *Nature Medicine*. 2010; 16:324-8.
- [41] Barouch DH, Stephenson KE, Borducchi EN, Smith K, Stanley K et al. Protective efficacy of a global HIV-1 mosaic vaccine against heterologous SHIV challenges in rhesus monkeys. *Cell*. 2013; 155: 531-539.

- [42] Jones AJ, Chamcha V, Kesavardhana S, Shen X, Beaumont D et al. A Trimeric HIV-1 Envelope gp120 Immunogen Induces Potent and Broad Anti-V1V2 Loop Antibodies against HIV-1 in Rabbits and Rhesus Macaques. *Journal Virology*. 2018; 92(5): e01796-17. Doi: 10.1128/JVI.01796-17.
- [43] Binley JM, Sanders RW, Clas B, Schuelke N, Master A et al. A Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Complex Stabilized by an Intermolecular Disulfide Bond between the gp120 and gp41 Subunits Is an Antigenic Mimic of the Trimeric Virion-Associated Structure. *Journal of Virology*. 2000; 74(2):627-643. Doi: 10.1128/JVI.74.2.627-643.2000.
- [44] Rogier WS, van Gils MJ, Derking R, Sok D, Ketas TJ et al. HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. *Science*. 2015; 349(6244):156-191. Doi: 10.1126/science.aac4223.
- [45] Pauthner M, Havernar-Daughton, Sok D, Nikolola JP, Batidas R et al. Elicitation of Robust Tier 2 Neutralizing Antibody Responses in Nonhuman Primates by HIV Envelope Trimer Immunization Using Optimized Approaches. *Immunity*. 2017; 6(6): 1073–1088. Doi: 10.1016/j.immuni.2017.05.007.
- [46] Sok D, Le KM, Vadnais M, Saye-Francisco K, Jardine J, Burton DR et al. Rapid elicitation of broadly neutralizing antibodies to HIV by immunization in cows. *Nature*. 2017; 548 (7665): 108-111. Doi: 10.1038/nature23301.
- [47] Dosenovic P, von Boehmer L, Escolano A, Jardine J, Freund NT et al. Immunization for HIV-1 Broadly Neutralizing Antibodies in Human Ig Knockin Mice. *Cell*. 2015; 161 (7): 1505-1515. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.003>.
- [48] Ciro AC. Vacunas: prevención de enfermedades y protección de la salud. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; OMS; 2004. P. 211-213.
- [49] Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*. 2008; 372(9653):1881–1893.
- [50] Grey GE, Andersen-Nissen E, Grunenberg N, Huang Y, Roux S et al. HVTN 097: Evaluation of the RV144 Vaccine Regimen in HIV Uninfected South African Adults. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2014; 30 (S1): A33-A34.
- [51] Hsu DC, O'Connell RJ. Progress in HIV vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2017; 13(5): 1018-1030. Doi: 10.1080/21645515.2016.1276138.
- [52] National Institute of Allergy and Infectious Disease [Sede Web] [actualizado 24 de julio de 2017; consultado 17 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.niaid.nih.gov/news-events/experimental-hiv-vaccine-regimen-well-tolerated-elicits-immune-responses>.
- [53] National Institute of Allergy and Infectious Disease [Sede Web] [actualizado 30 de noviembre de 2017; consultado 17 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-partners-launch-hiv-vaccine-efficacy-study>.
- [54] AVAC Global Advocacy for HIV Prevention. [Sede Web] [consultado 17 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.avac.org/trial/hvt-117hpx2004ipcavd011traverse>.