

LA TERCERA REGIÓN VARIABLE DE LA GLICOPROTEÍNA EXTERNA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1. ESTRUCTURA, FUNCIONES BIOLÓGICAS E INMUNOGENICIDAD

Carlos A Duarte

División de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, Cubanacán, Ciudad de La Habana, C.P. 10600, Cuba. Teléfono (53-7) 218008, 218466, extensión 1656. Correo electrónico: carlos.duarte@cigb.edu.cu

ABSTRACT

More than six million of AIDS cases have been reported since the beginning of the HIV/AIDS pandemic. In addition, there were 21.8 millions HIV-1 infected persons by June 1996. In spite of recent improvements in the therapeutics, the development of a preventive vaccine is critical for the control of AIDS. The aim of this review is to present a profound view of one of the most attractive regions of the viral envelope: the V3 loop. In V3, the principal neutralizing domain of HIV-1 has been located, as well as epitopes for helper and cytotoxic T cells. Because of its exceptional features, it has been included in the vast majority of the vaccine candidates in evaluation. The main findings about the structure and polymorphism within this region are summarized. Despite its variability, certain structural parameters are conserved in order to permit the V3 loop to mediate important functions in the viral infection. A general hypothesis about the role of V3 loop in the events of viral entrance and tropism is advanced. Different studies demonstrate the existence of cross-reactivity among V3 peptides. Some human monoclonal antibodies recognize conserved epitopes in V3 from different clades and neutralize primary isolates. However, the relevance of these aspects for vaccine development is still uncertain. Finally, an overview of the main vaccine strategies involving V3 immunogens is presented.

Key words: HIV-1, neutralization, polymorphism, monoclonal antibodies, vaccines, AIDS

Biotecnología Aplicada 1997;14:1-22

RESUMEN

La infección por VIH-1/SIDA es una importante pandemia que afecta a toda la humanidad. Actualmente 21,8 millones de personas están infectadas con el VIH y alrededor de 7 000 contraen la infección cada día. Desde el inicio de la epidemia se han reportado más de seis millones de casos de SIDA. A pesar de recientes avances en la terapéutica con drogas antivirales, es evidente que el desarrollo de una vacuna preventiva es la única opción para lograr el control de la pandemia. El objetivo del presente trabajo es abordar con mayor profundidad el estudio de una de las regiones más fascinantes de la envoltura viral: el lazo V3. En V3 se localiza el dominio principal de neutralización del VIH-1 y a su vez coexisten epitopos para células T auxiliares y citotóxicas. Por estas características excepcionales, esta región ha sido incluida en casi todos los candidatos vacunales que se evalúan actualmente. Se resumen los principales hallazgos en cuanto a la estructura y el polimorfismo de esta región. A pesar de su variabilidad, determinados parámetros estructurales se conservan para permitir a la región V3 mediar importantes funciones en el proceso infeccioso. Se esboza una hipótesis general acerca del papel de V3 en el proceso de penetración viral, y se discute su influencia sobre el tropismo viral. Varios trabajos indican la existencia de reactividad cruzada entre péptidos de V3. Algunos anticuerpos monoclonales humanos contra V3 definen epitopos considerablemente conservados y han logrado neutralizar cepas primarias. Por último se ofrece una panorámica de las diferentes estrategias vacunales basadas en inmunógenos de la región V3.

Palabras claves: VIH-1, neutralización, polimorfismo, anticuerpos monoclonales, vacunas, SIDA

Introducción

Han pasado trece años desde que se aisló por vez primera el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (1) y doce desde que éste fuera caracterizado como el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (2). Más de seis millones de casos de SIDA han ocurrido en el mundo desde el inicio de la epidemia hasta 1996, y se estima que 21,8 millones de personas son actualmente portadores del VIH. Cada día se reportan

7 000 nuevas infecciones; el 98 % de éstas en el mundo subdesarrollado (3).

Durante los primeros años de la infección, la terapia antiviral, basada en la droga AZT, ha sido poco eficaz. En los últimos tres años se han desarrollado una docena de nuevas drogas antivirales inhibitorias de las enzimas virales reverso-transcriptasa y proteasa; en la clínica, estas drogas han mostrado ser más eficaces que el AZT. Por otra

parte, resultados recientes de ensayos clínicos con combinaciones de dos o tres de estas drogas han sido muy alentadores y han abierto una etapa de mayor optimismo en la terapia del SIDA. No obstante, es evidente que la terapia antiviral no es la solución para el SIDA como pandemia, ya que el 94 % de las personas infectadas con el VIH viven actualmente en países del tercer mundo, donde no hay acceso a los medicamentos más elementales. Estas razones respaldan con fuerza la necesidad urgente de desarrollar una vacuna eficaz contra el SIDA, dirección en la que se vienen realizando intensos esfuerzos en todo el mundo.

A pesar de indiscutibles avances en el conocimiento de los aspectos básicos de la infección por VIH, las investigaciones se desarrollan en una atmósfera de gran incertidumbre. La falta de conocimiento de los indicadores de protección, la ausencia de un modelo animal que reproduzca la enfermedad y la dificultad adicional que impone el polimorfismo del virus son los tres obstáculos principales para el desarrollo de una vacuna.

Esta situación ha provocado que se exploren una amplia gama de estrategias vacunales, entre ellas: vacunas atenuadas (4), subunidades recombinantes (5), vectores vivos (6-8), péptidos sintéticos (9) y ADN desnudo (10, 11). Algunas de estas estrategias están representadas en los 24 candidatos vacunales evaluados en un número considerable de ensayos clínicos de Fase I y II en humanos. Existen una serie de revisiones recientes que abordan estos aspectos (12-14). El objetivo del presente trabajo es abordar con mayor profundidad el estudio de una de las regiones más fascinantes de la envoltura viral: el lazo V3.

Posiblemente no exista en otro virus una región que haya sido tan estudiada y que genere opiniones tan controvertidas. En V3, epitopos de unión de anticuerpos neutralizantes coexisten con epitopos para células T auxiliares (Th) y citotóxicas (CTL). Por otra parte, es considerada una pieza clave en el proceso infeccioso, ejerce una influencia importante sobre el tropismo viral y se especula además que desempeña un papel protagónico en la patogénesis de la enfermedad. Por sus características excepcionales, esta región ha sido incluida de una u otra forma en casi todos los candidatos vacunales que se evalúan actualmente.

Epitopos para anticuerpos neutralizantes en el VIH-1

Con la excepción de un reporte aislado de anticuerpos neutralizantes contra la proteína externa de la cápsida p17 (15), los epitopos blanco de la acción de anticuerpos neutralizantes se localizan en la envoltura del virus. Ésta está formada por dos glicoproteínas: la gp41 o proteína transmembránica y la gp120 o proteína externa.

gp41

Se han descrito dos sitios blanco de anticuerpos neutralizantes en la proteína transmembránica. El primero fue reportado por Chanh TC *et al.* (16) en la región 735-747 y confirmado a través de experimentos de inhibición de la actividad neutralizante de sueros humanos (17) y mediante la expresión de este fragmento en poliovirus (18).

Broliden PA *et al.* (17) reportaron por primera vez la región conservada 647-671 como blanco de anticuerpos neutralizantes. Los péptidos de esta región son capaces de inhibir el efecto neutralizante de sueros humanos. Este hallazgo fue confirmado por la obtención de un anticuerpo monoclonal (AcM) humano neutralizante que reconoce la secuencia ELDKWA en la posición 662-667 (19). La inmunogenicidad de estos sitios en humanos parece ser débil ya que la mayoría de los anticuerpos contra gp41 están dirigidos contra una región conservada inmunodominante y no son neutralizantes (20).

gp120

Uno de los primeros reportes de epitopos de anticuerpos neutralizantes en la gp120 fue el de Ho D *et al.* (21), quienes generaron antisueros neutralizantes en conejos a través de la inmunización con un péptido del segundo dominio conservado (aa 254-274). Este resultado fue confirmado para primates (22), aunque otros autores no fueron capaces de reproducirlo (23).

También se han descrito anticuerpos neutralizantes en macacos contra las regiones 152-176, 193-218 y 206-230 de la gp120 (22). La primera de estas regiones se ubica entre los dominios V1 y V2 y sobrelapa con el péptido 164-187 también descrito como sitio de neutralización en la región V2 (24). Otros autores también han reportado generación de anticuerpos neutralizantes con péptidos de V2 (25).

AcMs de ratón contra la región C4 neutralizan diferentes cepas de VIH-1 (26). Esta región, que forma parte del sitio de unión al receptor, es inmunosilente en humanos. Por otra parte, se ha descrito la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el extremo carboxilo terminal (498-508) en conejos (27) y en sueros humanos (17). No obstante, el principal dominio neutralizante (PND) de la envoltura del VIH-1 se localiza en la región V3.

Hasta aquí mencionamos epitopos secuenciales y poco dependientes de la estructura terciaria de la proteína. Sin embargo, diferentes trabajos han demostrado que existen epitopos neutralizantes de naturaleza conformacional en la envoltura (28, 29). Los anticuerpos que reconocen estos epitopos muestran un espectro neutralizante más amplio que la mayoría de los anticuerpos contra V3 y otras regiones. Se considera que los bajos títulos neutralizantes contra diferentes cepas de VIH-1 observados en sueros humanos son mediados por este tipo de

anticuerpos (30), e incluso otros experimentos sugieren que la mayor parte de la respuesta contra gp120 está dirigida contra epitopos conformacionales (31).

La tercera región variable del VIH-1 contiene el determinante principal de neutralización del VIH-1

En 1987 se publicaron los resultados de un estudio de predicción de epitopos en la envoltura del VIH-1 (32). Para esto se empleó un programa que integra diferentes parámetros como hidrofiliidad, probabilidad de giros β , accesibilidad y movilidad. Dentro de las regiones señaladas como probable epitopo B estaba la tercera región variable (V3) de la gp120.

Estas predicciones se verificaron independientemente por varios grupos de investigadores. En el primero de estos trabajos se describió la generación de anticuerpos neutralizantes en chivos inmunizados con el péptido de dieciocho aminoácidos SP10 acoplado al toxoide tetánico (33). Este péptido representó la región V3 del aislamiento III B y no indujo anticuerpos neutralizantes contra las cepas MN y RF. Por otra parte, un péptido similar con la secuencia de la cepa RF, neutralizó sólo a ésta y no a las cepas MN o III B.

Rusche JR *et al.* (34) reportaron la obtención de antisueros contra gp120 recombinante producida en células de insectos y contra un fragmento de ésta (PB1) obtenido en bacterias. Estos antisueros inhibieron la formación de sincicios provocada por el VIH-1 *in vitro*. Su actividad inhibitoria fue a su vez completamente bloqueada por un péptido de 25 aminoácidos de la región V3.

Goudsmit J *et al.* (35) encontraron que sueros neutralizantes de chimpancés infectados con VIH-1 eran capaces de reconocer el péptido de catorce aminoácidos de V3 IRIQRGPGRAVTIG. Sueros sin capacidad neutralizante no mostraron reactividad contra este péptido. Los residuos variables a ambos lados del centro GPGR resultaron críticos para la unión de los anticuerpos.

Los trabajos citados, y otros posteriores, establecieron que en la región V3 está ubicado el determinante principal de neutralización (PND) del VIH-1. Por ejemplo, la eliminación de la región codificante para V3 del gen de la gp120 originó una proteína incapaz de inducir anticuerpos neutralizantes (36). Se demostró que solo ocho aminoácidos en la zona central pueden acomodar un epitopo neutralizante (37, 38). Los cinco aminoácidos PGRAF son antigénicamente activos frente a sueros humanos, aunque la avidez de la interacción disminuye de forma significativa (39).

Existen elementos experimentales que indican que el PND se limita a una región de aproximadamente 15-20 aminoácidos en el centro del lazo V3.

Un AcM dirigido contra la secuencia IGKIGNMRQ en la base carboxilo terminal del lazo no mostró actividad neutralizante (40).

Estos resultados permitieron identificar que el PND contiene epitopos poco dependientes de la estructura terciaria de la proteína. En términos más precisos, péptidos de esta región adoptan una conformación que mimetiza con éxito su propia estructura en la proteína nativa. Esta importante propiedad permite su manipulación sin menoscabo de su integridad antigénica y manteniendo la capacidad de inducir una respuesta humoral neutralizante contra el VIH-1.

Estructura y variabilidad del PND

Estructura

Las primeras predicciones de la estructura secundaria de esta región estimaron como muy probable la presencia de un giro β en la zona central del lazo (41). La aplicación de técnicas de resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular a péptidos de V3 corroboró la existencia de un giro β de tipo II tanto en péptidos cíclicos de 42 aminoácidos como en péptidos lineales de 24 residuos (42). Estas observaciones indican que el giro β no depende de la integridad del puente disulfuro y que existe un predominio de estructura secundaria al azar, aunque otros autores han encontrado una marcada tendencia a la formación de hélice alfa en la porción C terminal (43).

Evidencias más precisas de la disposición tridimensional se obtuvieron recientemente a través del análisis cristalográfico del complejo entre el fragmento Fab de los AcMs 59.1 y 50.1 y el péptido de V3 de la cepa MN (44, 45). La región central conservada mostró en efecto una estructura de giro β tipo II (GPGR), pero además se encontró una conformación general en forma de S, con la presencia de otros dos giros β de tipo III y I (aminoácidos GRAF y RAFY, respectivamente) (Figura 1). La conformación del péptido se estabiliza por tres puentes de hidrógeno internos entre los residuos G319-R322, G321-F324 y R322-Y325. Es muy interesante destacar que este péptido adoptó una conformación prácticamente idéntica en su asociación con estos dos anticuerpos monoclonales con diferentes características de unión (Tabla 1).

Los estudios mencionados indican que la estructura de la región V3 se define de forma independiente al resto de la proteína y explica que fragmentos aislados de ella adopten una conformación similar a la de la proteína nativa. Esta propiedad hace muy atractivo su empleo como inmunógeno.

No obstante algunos trabajos sugieren la existencia de epitopos definidos por interacciones entre V3 y otros dominios de la gp120. Por ejemplo, cambios de aminoácidos fuera de V3 confirieron resistencia a la neutralización por un AcM contra V3 (62).

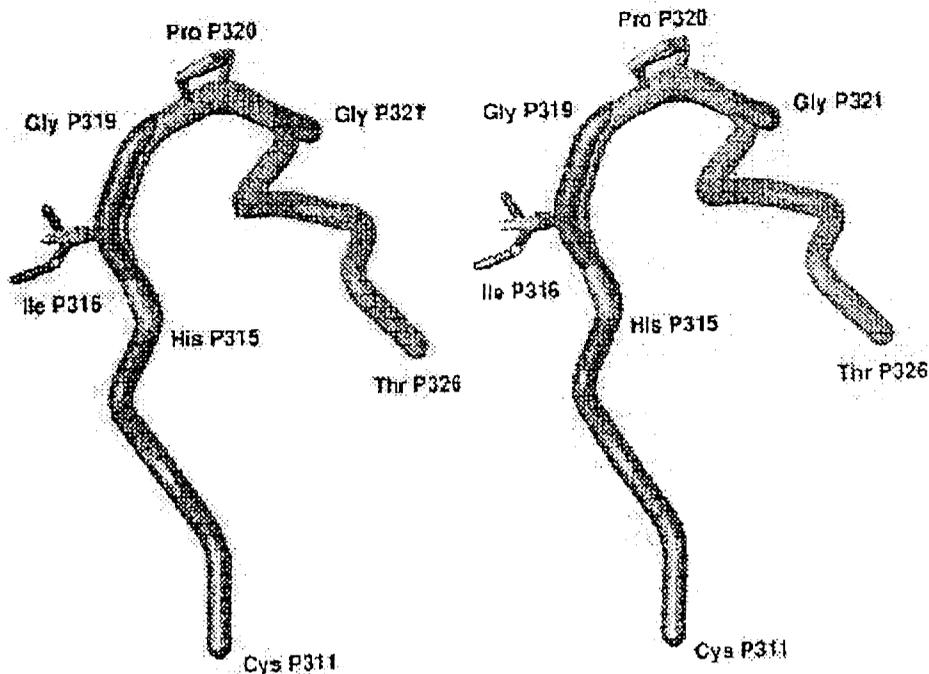


Figura 1. Estructura del péptido de la región V3 del aislamiento MN cristalizado con fragmentos Fab de dos anticuerpos monoclonales diferentes. Tomada de la referencia 45.

Se ha determinado que los aminoácidos de la secuencia 113-142 están cercanos al V3 en la estructura tridimensional de la proteína y en su conjunto constituyen un epitopo discontinuo (63, 64). Mutaciones puntuales en estos epitopos afectan la neutralización del VIH-1 por anticuerpos contra V3. Adicionalmente se ha encontrado que la sustitución de V3 en diferentes contextos de gp120 modula de forma importante la respuesta neutralizante contra el virus (65).

El conjunto de estas observaciones indica que no se puede subestimar el papel de la interacción entre V3 y otros dominios de la gp120 en la definición de epitopos de neutralización del VIH, aunque esto no está en contradicción con la existencia de epitopos en V3 que son independientes de estas restricciones estructurales.

Polimorfismo genético

El polimorfismo genético del VIH, principalmente de las proteínas de la envoltura, es muy elevado. Esto viene dado por la baja fidelidad de copia de la reverso transcriptasa viral (RT) que introduce aproximadamente un error por cada 700 a 10^4 bases incorporadas (66). No obstante esta tasa de mutaciones no es diferente de la de otros retrovirus. Experimentos recientes sobre la dinámica de la

infección por VIH indican que la coexistencia de un número tan elevado de variantes virales (cuasiespecies) en el organismo infectado es consecuencia, en primer término, de la alta velocidad de replicación del virus. Según cálculos de dos grupos independientes se generan diariamente 10^9 partículas virales (67, 68).

El estudio de la variabilidad genética de la región V3 puede dividirse en tres etapas bien definidas. La primera se enmarca entre la aparición de la primera secuencia del genoma de VIH-1 (69) y la publicación del trabajo de La Rosa GJ *et al.* (41). En esta etapa se secuenció el V3 de una veintena de cepas en su gran mayoría provenientes de Europa y Estados Unidos (Tabla 2).

El citado trabajo de La Rosa GJ *et al.* (41) fue el primer reporte extenso sobre la variabilidad del V3. En éste se describió la composición de la región V3 en 245 aislamientos, principalmente de Estados Unidos. Las conclusiones de este trabajo fueron estimulantes para los defensores de la importancia del V3 como candidato vacunal, pues se observó que el polimorfismo no era tan grande como se estimó a partir de los primeros datos de secuencia. Las sustituciones de aminoácidos encontradas fueron generalmente conservativas y se confirmó que la porción central del lazo, fundamentalmente el tetrapéptido GPGR, es la más conservada.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales contra la región V3.

AcM	Origen	Referencia	Ka	Epitopo	Potencia
0,5B	murino	46	2×10^{-8}	RGPGRAVFTIGKIG	S ID ₅₀ 1 µg/mL
9248	murino	47	3×10^{-8}	NNTRKSIKIQRG	S ID ₅₀ 25 µg/mL
BAT123	murino	48	-	RIGRGPGRVFTIGK	N ID ₉₀ 1 µg/mL
P4D10	murino	49	-	IQRGPGRAFV	-
N701-91	humano	50	-	RIHIGPGRAFV	N ID ₅₀ 0,9 µg/mL
5025A	humano	51	-	GRAVTIG	N ID ₉₀ 10 µg/mL
19b	humano	50, 52, 53	-	I---G--FY-T	-
NM-01	murino	54	-	GPGR	N ID ₅₀ 1 µg/mL
257-20	humano	55	4×10^{-6}	KRIHI	N ID ₅₀ 3 µg/mL
268-110	humano	55	8×10^{-7}	HIGPGR	N ID ₅₀ 23 µg/mL
447-D	humano	56	-	GPGR	NID90 <10µg/mL
Loop 2	humano	57	-	SISGPGRAFVTG	-
M77	murino	58	-	IRIGRGPGRVFTI	N ID ₉₀ 0,3 µg/mL
50-1	humano	59	3×10^{-5}	GPGRAF	N S ID ₉₀ 25 µg/mL
83-1	humano	59	3×10^{-7}	HIGPGRAF	N S ID ₉₀ 2,5 µg/mL
58-2	humano	59	1×10^{-8}	IXIGPGR	N S ID ₉₀ 0,25 µg/mL
10F10	murino	60	$x 10^{-8}$	IHIGP-R	N ID50 1 µg/mL
2C4	murino	60	$x 10^{-8}$	IHIG--R	N ID50 1 µg/mL
694/98D	humano	61	-	GRAF	-

IS) inhibición de la formación de sincicios.

N) inhibición de la producción de p24 viral.

ID₅₀(90) concentración de anticuerpo necesaria para reducir en un 50 (90) % la infección por el virus.

La tercera etapa se caracteriza por una explosión informativa sobre secuencias de esta región que han sido recogidas en la recopilación de datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de retrovirus publicados por el laboratorio de Los Álamos (70). Esta base de datos que se actualiza anualmente contiene la información de cepas circulantes en diversas áreas geográficas. Un aporte importante a este conocimiento lo ha brindado el programa de estudios de polimorfismo viral que ha conducido en los últimos años la OMS en Brasil, Ruanda, Uganda y Tailandia como preparación para el desarrollo de futuros ensayos de eficacia de vacunas.

Actualmente los aislamientos de VIH-1 se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a la secuencia de ADN del gen de la envoltura. El grupo M o grupo principal se divide a su vez en ocho "clades" o subtipos desde el A hasta el H, mientras que el O ("outliers") reúne un pequeño grupo de secuencias que divergen considerablemente del grupo principal. La Tabla 3 muestra las secuencias consensos de la región central de V3 para cada uno de esos subtipos.

Sin embargo, dentro de estos subtipos existe heterogeneidad en la secuencia de aminoácidos de la región V3, y por otra parte, cepas que clasifican en diferentes subtipos presentan considerable homología dentro de V3. Por su importancia en el desarrollo de vacunas Korber y Myers (71) han propuesto un sistema de clasificación paralelo basado en la secuencia de aminoácidos de la región central de V3. Este sistema es denominado fenotípico y agrupa las secuencias de V3 en 20 grupos. Hasta el mo-

mento no se ha estudiado detalladamente el grado de reactividad cruzada entre péptidos de diferentes grupos. Es muy probable que ni aun la clasificación fenotípica responda a un criterio inmunológico funcional de reactividad cruzada entre cepas.

En Cuba se ha venido desarrollando en los últimos tres años un estudio genético y virológico de las cepas circulantes. Los resultados obtenidos con más de 40 secuencias de la región C2-V3 indican la coexistencia de cepas de los subtipos B y C (72, 73).

Los estudios longitudinales realizados demuestran que el polimorfismo en la secuencia de VIH-1

Tabla 2. Secuencia de la región central de V3 de 16 cepas de laboratorio de VIH-1.

Denominación	Subtipo	Secuencia
US.CDC42	B	KRVTLGPGRVWYTT
ZR.NDK	D	QRTSIGLRQSLYTI
US.BRVA	B	KRITMGPGRVYTT
FR.LAI	B	IRIQRGPGRVFTI
HT.RF	B	KSITKGPGRVIYAT
US.BAL	B	KSIHIGPGRVFTI
US.SC	B	RSIHIGPGRVFTI
US.SF162	B	KSITIGPGRVFTI
US.SF2	B	KSIYIGPGRVFTI
US.NY5CG	B	KGIAIGPGRVFTI
US.JRSCF	B	KSIHIGPGRVFTI
US.MN	B	KRIHIGPGRVFTI
ZR.MAL	D	RGIHFGPGQALYTT
ZR.ELI	D	QRTPIGLGQSLYTT
ZR.JY1	D	QSTPIGLGQALYTT
ZR.ZZ6	D	QRTSIGLGQALYTT

aumenta dentro de cada individuo (74, 75) y la región V3 no es una excepción. Se ha descrito que la heterogeneidad de V3 puede aumentar hasta el 19,5 % entre clones de un mismo paciente (76). Al estudiar la secuencia de V3 en seis niños infectados por transfusión y la del donante de plasma, se encontraron importantes diferencias entre los infectados. La distancia entre los aislamientos virales de éstos y la cepa original aumentó con el tiempo y esta variación fue dependiente del hospedero, rápida e independiente del nivel de antígeno expresado (77).

La aparición de nuevas variantes en la región V3 y la relación observada entre la respuesta de anticuerpos contra V3 y la diversidad de secuencia en individuos infectados (78) refleja la existencia de una fuerte presión selectiva del sistema inmune. Adicionalmente, según se ha discutido antes, mutaciones en otras regiones de la envoltura pueden provocar cambios que afectan la conformación de V3 y sus interacciones con otros dominios de la gp120 y le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero (79, 80).

Sin embargo, a pesar de que la variación dentro de V3 de cada individuo aumenta con el tiempo, la secuencia consenso apenas sufre variaciones en un período de diez años (81). Por otra parte, se observa una tendencia a conservar el carácter (tipo particular y posición) de los aminoácidos de esta región (41). Esto es, probablemente, el reflejo de una presión selectiva dirigida a conservar una estructura específica en el V3, e indica que éste debe desempeñar una función biológica importante para el virus.

En resumen, la composición de aminoácidos de V3 parece ser la resultante de dos fuerzas. Por una parte, la respuesta inmune del hospedero que tiende a seleccionar mutantes de escape, y por otra, el propio papel de V3 en el proceso infeccioso que tiende a conservar las variantes mejor adaptadas para la replicación exitosa.

Polimorfismo antigénico. Serología dirigida con péptidos de V3

Los anticuerpos anti V3 en sueros humanos aparecen en los primeros seis meses después de la seroconversión y la subclase predominante en los sueros humanos es IgG1 (38). La relación entre la serología con péptidos de V3 y la secuencia de aminoácidos de las cepas circulantes ha sido objeto de controversia en el mundo. Los anticuerpos contra el V3 de la cepa MN son predominantes no sólo en sueros de Estados Unidos y las Américas (95 %) sino también en otros países de África Occidental (80 %) como Zaire y Zimbawe (82, 83). Por el contrario sueros provenientes de África Oriental muestran sólo un 30 % de reactividad contra MN. Esta observación no concuerda con los datos de secuencia del ADN viral, ya que el V3 de los aislamientos de África es muy diferente al del MN (71).

Carrow EN *et al.* (82) encontraron mayor frecuencia de respuesta en sueros africanos contra un péptido de la cepa MN que contra un péptido de la cepa africana Z3. No obstante, la secuencia de V3 de Z3 difiere bastante del consenso de los grupos circulantes en la región, por lo que es muy cuestionable su empleo como prototipo de las cepas africanas. Se argumenta que la elevada frecuencia de aparición de anticuerpos contra el V3 consenso de América y Europa en África puede ser indicativa de un origen africano para este tipo de aislamiento (83). No obstante, esta hipótesis no parece ser convincente para explicar la ausencia de esta secuencia en los virus aislados en África.

Una explicación alternativa es la existencia de reactividad cruzada entre cepas de África (subtipos A, C y D) y América (subtipo B). En este sentido se ha descrito que sueros de individuos infectados con virus del subtipo B reconocen péptidos consenso del subtipo D y viceversa (84). En nuestro laboratorio se logró inhibir la reactividad de sueros contra el péptido consenso B (KSIHIGPGRAFYTG) con péptidos de cepas características de África (KSIRIGPGQAFYATG) (85). Adicionalmente, en Etiopía se reportó un 39 % de sueros con reacción cruzada entre los subtipos A y C (86), mientras que otros investigadores también han encontrado alta frecuencia de reactividad cruzada entre péptidos de la misma área geográfica (87).

A pesar de que la existencia de reactividad cruzada incrementa la ambigüedad de los resultados, se ha demostrado la utilidad potencial de la serología para la tipificación de las cepas circulantes dentro de una región determinada. Por ejemplo, en Tailandia fue posible discriminar por serología entre individuos infectados por virus de los subtipos B y E, con un 93 % de coincidencia entre serotipaje y genotipaje (88, 89). En un estudio similar, con sueros de diferentes áreas geográficas, se encontró un 90 % de coincidencia entre la secuencia de ADN y el serotipo (90). Esto fue posible, a pesar de la existencia de sueros con reactividad cruzada, por la aplicación de un ELISA en condiciones limitantes de antígeno en el recubrimiento. Este ensayo favorece la detección de anticuerpos de mayor afinidad y por tanto menos polireactivos. No obstante, en otros

Tabla 3. Secuencias consenso de la región central de V3 de los subtipos de VIH-1.

Subtipo	Secuencia
A	RKSVRIGPGQAFYAT
B	RKSIHIGPGRAFYT
C	RKSIRIGPGQTFYAT
D	RGRTHIGPGQALYTT
E	RTSITIGPGQVFYRT
F	RKSIHLGPGQAFYAT
G	RKSITIGPGQAFYAT
H	RKSIRIGPGQAFHAI
O	VQEIRIGPMAWYSMG

estudios con sueros provenientes de cuatro países diferentes no se encontró una correlación tan directa entre genotipo y fenotipo (91).

El conjunto de estos resultados sugiere que sólo en determinadas áreas epidemiológicas donde coexistan cepas virales divergentes en la región V3 puede ser de utilidad la serología, ya que donde haya promiscuidad de cepas relacionadas antigénicamente la existencia de reactividad cruzada puede hacer imposible la tipificación por esta vía. La selección de los péptidos adecuados para cada región, así como la metodología empleada, parecen determinantes para lograr un resultado exitoso.

También se reporta la existencia de sueros "no tipables" que no reconocen a ninguno de los péptidos empleados. Estos individuos pueden haber sido infectados con variantes virales muy alejadas antigénicamente de los péptidos usados en el tipaje. Por ejemplo, el suero de un individuo infectado en Cuba con una cepa del grupo B con la secuencia atípica en el V3 GRGR no reconoció ninguno de los péptidos de V3 que se evaluaron, pero sí al péptido homólogo (73).

A pesar de la vigorosa respuesta humoral desarrollada desde fases tempranas, no se logra contener la evolución de la enfermedad. Se argumenta que el sistema inmune del hospedero no es capaz de adaptarse a la variación sostenida de las principales regiones antigénicas del virus. Se ha comprobado que en los primeros tiempos después de la seroconversión, la especificidad de los anticuerpos anti V3 coincide con la secuencia de ADN encontrada para cada individuo. En individuos estudiados cinco años después de la seroconversión el patrón de respuesta humoral contra el V3 no difiere generalmente del anterior, sin embargo, el tipo de secuencia predominante en el virus varía (92).

Nara y Goudsmit (93) acuden a la hipótesis conocida como "Original Antigenic Sin" (OAS) para explicar esta observación. Según esta teoría algunos antígenos de naturaleza variable como el V3 predeterminan el comportamiento del sistema inmune, de forma que al ponerse en contacto con una nueva variante se estimulan preferentemente los clones de células B de memoria cuyos receptores de superficie reconocen las regiones comunes a ambas variantes. Según estos autores, esto "congela" de cierta forma el repertorio de inmunoglobulinas generado, obstaculizando su diversificación.

Objeto de debate ha sido también la relación entre anticuerpos anti V3 y la evolución a SIDA. Según Fenouillet E *et al.* (94) la presencia de anticuerpos de alta afinidad contra péptidos de V3 correlacionó con el estadio clínico del paciente. Resultados semejantes fueron encontrados en pacientes cubanos, y adicionalmente, también se evidenció correlación entre anticuerpos antipéptidos V3 y la progresión a la enfermedad (85). Estos

resultados fueron confirmados empleando polipéptidos multiepitópicos que incluyen varias regiones V3 (Duarte C, resultados no publicados). Sin embargo Holmback K *et al.* (87) no encontraron correlación entre los anticuerpos contra péptidos de V3 autólogos y el estado clínico. La explicación para esta discrepancia puede estar en que en este estudio, a diferencia de los anteriores, solo se evaluó la respuesta anti V3 de forma cualitativa.

El papel de los anticuerpos contra V3 en la transmisión materno-fetal del VIH-1 ha sido muy discutido en la literatura. Se ha reportado que la presencia de anticuerpos contra un péptido de la base de V3 en madres infectadas correlaciona con la ausencia de transmisión a sus hijos (95). Posteriormente Devash Y *et al.* (96) encontraron correlación entre la presencia de anticuerpos de alta afinidad para V3 en madres y la ausencia de transmisión del virus a los recién nacidos. Sin embargo, otros autores no han sido capaces de corroborar esta observación (97-99). El hallazgo, por estos últimos autores, de anticuerpos contra variantes de V3 en el suero del recién nacido y no en el de su madre, sugiere que la infección es causada por mutantes que escapan a la respuesta inmune materna.

Los resultados de serología con péptidos sintéticos deben ser analizados con precaución, pues la metodología varía de forma importante de laboratorio en laboratorio y se ha comprobado que estas variaciones pueden provocar diferencias en los resultados obtenidos. Por ejemplo, la inclusión de Tween 20 en el diluyente de las muestras amplía la reactividad de los anticuerpos con péptidos de V3 de diferentes cepas y no siempre la reactividad de AcMs contra péptidos de V3 en ELISA predice satisfactoriamente su capacidad de unión a gp120 (100).

Según la experiencia de nuestro laboratorio la presentación de los péptidos acoplados a seroalbúmina bovina mejora significativamente la capacidad de detección de sueros humanos (85). Este procedimiento evita la pérdida de epitopos producida por la interacción de residuos importantes con el plástico.

Funciones Biológicas de V3

V3, infección viral y tropismo

El V3 es importante para la entrada viral y la formación de sincicios

El VIH penetra en la célula blanco a través de un proceso directo de fusión entre la membrana viral y la membrana citoplasmática. Este mecanismo de fusión, independiente del pH del medio, es análogo a la formación de sincicios que tiene lugar entre las células infectadas y no infectadas. Diversos estudios indican que V3 juega un papel importante en ambos eventos.

Cuando se mutan las cisteínas que forman el puente disulfuro que define el lazo V3, o se elimina completamente esta región, la proteína gp160 no sufre procesamiento proteolítico ni es capaz de enlazar CD4 y el virus resultante no es infectivo (101-103). Esto demuestra que la existencia de este lazo es esencial para la conformación tridimensional correcta y funcional de las proteínas de la envoltura.

Por otra parte, la delección de fragmentos de V3 (103, 104), la inserción de cinco aminoácidos (105), y mutaciones puntuales en esta región (106-111), no alteran el procesamiento de la gp160 ni su capacidad de unión a CD4, pero sí la infectividad del virus y su propiedad de inducir la formación de sincicios.

Los aislamientos de VIH-1 se han clasificado de acuerdo a su fenotipo y tropismo en dos grupos: (a) monocitotrópicos (MT), no inductores de sincicios (NSI) y de baja capacidad replicativa (SL) y (b) linfocitotrópicos (LT), inductores de sincicios (SI) y de alta capacidad de replicación (RH). La aparición de cepas SI ha sido asociada a la progresión a SIDA (112-115). El reemplazo de V3 de una cepa SI a una NSI le confirió la capacidad de inducir sincicios y viceversa (100).

Se ha especulado que el carácter básico de V3 es lo que le permite interactuar con moléculas negativas en la superficie celular para establecer una primera interacción que facilite el encuentro con el receptor CD4 (117). Para apoyar esta hipótesis existen datos experimentales que demuestran la interacción de péptidos de V3 con sulfato de dextran (118), sulfato de heparan (119) y heparina (120).

Adicionalmente se ha demostrado la importancia del número y la posición de los residuos positivos en V3 en el fenotipo viral (121-126). En particular la presencia de residuos básicos en las posiciones 306 y 320 está fuertemente asociada al fenotipo de SI y RH (116).

V3 y tropismo

En los últimos años se ha evidenciado que el tropismo del VIH-1 es más complejo que lo que inicialmente se pensó. Además de linfocitos T4, los monocitos y otras células del sistema retículo endotelial que presentan el receptor CD4, se ha demostrado que el virus infecta de células de origen nervioso y epitelial.

El tropismo por linfocitos o monocitos es muchas veces excluyente en las cepas de VIH-1 y fue asociado inicialmente con una región de la envoltura que incluye V3 (127, 128). Más tarde, se precisó que el intercambio de un fragmento de 20 aminoácidos de la región V3 entre la cepa linfocitotrópica III B y la monocitotrópica BaL (Tabla 4) es suficiente para revertir ambos fenotipos (129).

Otros cambios dentro de V3 también afectan el tropismo por monocitos (130-133) o células nerviosas (134, 135). Finalmente virus mutantes en los cuales la prolina en posición 313 del V3 fue sustituida por alanina son capaces de infectar las líneas MOLT4, CEM y SUPT1, de origen T, pero no la línea de origen B AA5 (109).

Estos resultados demuestran que la secuencia de V3 define el tropismo del VIH por diferentes sustratos celulares.

Papel de V3 en el proceso infectivo

Se conoce que el V3 no forma parte del sitio de unión con alta afinidad al receptor CD4. ¿Cuál es entonces su papel en el proceso de penetración del virus? A continuación se enumeran algunos resultados que pueden ayudar a aclarar este aspecto.

1. Existe interacción entre péptidos de V3 y ectoproteasas de distintos tipos celulares. La triptasa T12, presente en la membrana de la línea linfocitoide MOLT-4, se une a la gp120 a través del V3 (136, 137). La región V3 es sensible a la proteólisis por triptasa, trombina y catepsina B (138). Péptidos de V3 de la cepa III B inhibieron la actividad proteolítica de células Molt-4 sin sufrir procesamiento proteolítico importante (139). Una proteasa análoga, de tipo tripsina, ha sido descrita para la línea monocítica U937 (140). También se ha propuesto que la molécula CD26 o dipeptidil di-peptidasa sirve de segundo receptor a la gp120 en linfocitos y que interactúa con la región V3, aunque no se ha evidenciado que la corte (141). A partir de estos resultados se ha propuesto que el corte de V3 por una ectoproteasa de la membrana celular es un paso necesario para la entrada viral. Esta escisión induciría un cambio de conformación de la gp120 de forma tal que quede expuesto el fragmento hidrofóbico N terminal de la gp41 que interviene directamente en el mecanismo de fusión de membranas.
2. Diferentes autores coinciden en que péptidos sintéticos de la región V3 son capaces de unirse a CD4 y a un péptido del dominio D2 de esta molécula (142, 143). El dominio D2 de CD4 no participa en la principal interacción

Tabla 4. Fragmento de V3 que definió el tropismo de las cepas BaL y III B de VIH-1.

Cepa	Secuencia	AA+	AA-
BaL	SIHI . . GPGRALYTTGEIIGDI	2	1
III B	K-R-QR-----F--I-K.--NM	4	0

AA+): número de residuos con carga positiva.
 AA-): número de residuos cargados negativamente.
 -): igual aminoácido.
 .): no existe residuo en esa posición.

con gp120 y ha sido asociado con el proceso de fusión de membranas (144-146). Cambios puntuales de aminoácidos en V3 aumentaron la resistencia del virus a la neutralización por CD4 soluble (147).

El significado biológico de esta interacción no está claro, ya que mientras péptidos de V3 potenciaron la infectividad del VIH a través de un mecanismo dependiente de CD4 (148) otros estudios han reflejado un efecto completamente opuesto (149). Adicionalmente, péptidos de seis o catorce aminoácidos ramificados alrededor de un núcleo de lisinas, (Multi-Antigenic-Peptides, MAPs) demostraron capacidad de unión a CD4 en linfocitos y macrófagos y efecto inhibitorio de la formación de sincicios (150-153).

- Existen evidencias que sugieren que V3 participa en un evento previo a la unión de alta afinidad gp120- CD4 y posiblemente de corta duración, ya que el virus necesita menos tiempo para escapar de los anticuerpos contra V3 que de anticuerpos contra CD4 (154). Estos resultados resultan difíciles de conciliar con el hecho de que V3 participe en la fusión de membranas pues este evento debe ocurrir necesariamente después de la unión al receptor. Es posible que estos datos experimentales estén viciados por las características particulares de los AcMs empleados, por lo que deberían ser comprobados empleando otros anticuerpos. Es posible también que el virus escape más rápido del AcM anti V3 porque esta región quede "inaccesible" a los anticuerpos después de la interacción entre gp120 y CD4.

Tomando en cuenta estas observaciones, junto a los elementos previamente expuestos que relacionan V3 con el tropismo, es posible proponer la siguiente hipótesis generalizadora:

- El V3, con su fuerte carga positiva, sirve para "localizar" al virión a la superficie celular a través de interacciones electrostáticas con moléculas cargadas negativamente.
- Después de ser "atraído" a la célula el virus se asocia fuertemente a CD4 a través de la interacción de alta afinidad. La región V3 queda protegida.
- V3 interactúa con otras moléculas de membrana, ya sean ectoproteasas, CD26, el dominio D2 del propio CD4 u otra molécula no identificada. Como resultado de esta interacción ocurren cambios conformacionales importantes que bien pudieran involucrar un corte proteolítico de V3 que facilitan la exposición del dominio fusogénico N terminal de gp41 y su inserción en la membrana y así provocar la fusión.

En este tipo de mecanismo el lazo V3 desempeñaría una doble función y la abundancia relativa de sus ligandos en la célula blanco dictaría la susceptibilidad de ésta a la infección por una u otra cepa viral.

Finalmente, el esfingolípido galactosil ceramida (Gal-Cer) ha sido descrito como receptor alternativo para el VIH-1 en células de tejido epitelial (155) y nervioso (156, 157). Adicionalmente se demostró que péptidos de V3 también pueden unirse a esta molécula y bloquear la infección por VIH, inhibiendo directamente su interacción con gp120 (158).

Inmunidad Humoral Contra V3

Anticuerpos monoclonales contra V3

AcMs murinos y humanos contra V3. Epitopos y características generales

Diferentes AcMs murinos y humanos han sido generados contra la región V3 de diferentes cepas de VIH-1 (Tabla 1). La actividad biológica de estos anticuerpos ha confirmado la importancia del V3 como epitopo principal de neutralización.

A través del empleo de péptidos con sustituciones de algunos aminoácidos se ha definido cuáles son los residuos claves en la interacción con el AcM. Estos aminoácidos pueden ser importantes, no sólo en la interacción con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos, sino también en la estabilización de la estructura del péptido a través de las interacciones débiles entre sus cadenas laterales.

El carácter restringido del efecto neutralizante de la mayoría de los AcMs generados (46-50, 55, 58, 60), hizo que se catalogara de forma general a los AcMs contra V3 como tipos específicos o cepas específicas. No obstante, este concepto ha tenido que ser revisado con la aparición de AcMs dirigidos contra las regiones más conservadas (51, 54, 56, 59), los cuales muestran un patrón de neutralización de cepas mucho más amplio.

Algunos anticuerpos monoclonales generados contra la región V3 del subtipo B reaccionaron en ELISA con la gp120 del subtipo F, y en un caso, con varios aislamientos del subtipo E, pero fallaron en reconocer cepas primarias de los demás subtipos (52). El AcM 19b mostró amplia reactividad contra gp120 de los subtipos A, B, C, E y F pero solo logró neutralizar los del subtipo B y débilmente los del C (159). Esto demuestra que la actividad de unión a péptidos no siempre es un buen indicador de actividad neutralizante, aunque se ha correlacionado la constante de disociación (Kd) de la interacción entre cada AcM y su péptido con su capacidad neutralizante (160).

Otras funciones mediadas por AcMs contra V3

Se ha comprobado que algunos de estos AcMs no solo presentan acción neutralizante de la infección por virus libre y de la inhibición de la formación de sincicios, sino que además son capaces de mediar *in vitro* la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (49) y la virólisis por fijación de complemento (161-162). Estos mecanismos pueden jugar un papel importante en la destrucción de células infectadas y partículas virales, respectivamente.

Sinergismo de la acción entre AcMs

Diferentes autores han demostrado que la combinación de AcMs contra V3 con otros AcMs desarrolla una actividad neutralizante superior a la simple adición de los efectos individuales.

AcMs humanos dirigidos contra el V3 (447-D) y la región de unión a CD4 (588-D) mostraron efecto sinérgico (163). Sueros de individuos inmunizados con vaccinia-gp160 y gp160 soluble potenciaron la neutralización mediada por un AcM contra el sitio de unión al CD4 (164). La actividad neutralizante de estos sueros humanos fue inhibida totalmente por incubación con péptido de V3, lo cual sugiere que los anticuerpos neutralizantes están dirigidos esencialmente contra esta región.

De forma opuesta se ha descrito que dos anticuerpos dirigidos contra el lazo V3 pueden establecer relaciones de competencia entre ellos. De esta manera un anticuerpo de menor capacidad neutralizante (9284) atenúa el efecto de uno más potente (0,5B) (47). Una posible explicación a este fenómeno puede ser la modulación, provocada por la unión del AcM 9284, de la conformación del lazo, de forma tal que se oculte el epitopo reconocido por 0,5B.

Anticuerpos de segunda generación

El empleo de anticuerpos monoclonales contra V3 en la inmunoterapia pasiva ha sido un objetivo de diferentes investigadores. Son conocidas las limitaciones que presentan los AcMs murinos para la clínica, como por ejemplo la inducción de respuesta inmune y la incapacidad para mediar algunas funciones biológicas. Por otra parte, si bien se ha logrado obtener AcMs humanos, estos clones son generalmente inestables, de pobre crecimiento y baja secreción de anticuerpos, lo que dificulta su producción industrial. La sustitución mediante manipulación genética de las regiones constantes murinas por humanas ha permitido la obtención de AcMs quiméricos, los cuales conservan la afinidad y la actividad neutralizante del AcM original y a la vez incorporan otras funciones, como por ejemplo la capacidad para mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) (48, 49, 165).

La capacidad (mostrada por fragmentos Fab₂ (57) y Fab (166) de AcMs contra V3) de neutralizar la infección confirma que este proceso es independiente de las funciones biológicas del fragmento Fc o de la facultad de unir simultáneamente dos moléculas de gp120 en la superficie de un virión, o dos partículas virales independientes (*cross-linking*). Incluso, un péptido sintético de la tercera región determinante de la complementariedad (CDR3) del AcM F58 neutralizó la infección por la cepa LAI aunque con mucho menor eficiencia que el anticuerpo completo (167).

La más reciente tendencia en el desarrollo de anticuerpos monoclonales es sin duda la tecnología de obtención de fragmentos Fab a través de la construcción de librerías de genes variables en fagos. Se ha reportado la obtención y caracterización de Fabs de mediana afinidad contra epítopos conformacionales de la gp120 y contra la región V3 utilizando este sistema (57, 168, 169). Recientemente se logró incrementar la afinidad y el rango de neutralización de un Fab contra el dominio de unión al CD4 mediante mutaciones en los CDR (170).

Neutralización de cepas primarias

El ensayo de neutralización es un indicador de la capacidad de determinados anticuerpos de inhibir la infección de células susceptibles *in vitro*. Hasta ahora nos hemos referido a ensayos que utilizan como blanco líneas celulares CD4+ y cepas adaptadas a replicarse en estas condiciones (cepas de laboratorio). No obstante, en los últimos años se ha encontrado que los anticuerpos que muestran actividad neutralizante en estas condiciones no son capaces de neutralizar aislamientos primarios (AP), replicados exclusivamente en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Estos aislamientos son, fundamentalmente de fenotipo MT, NSI, SL. Vancott TC *et al.* (171) depletaron de anticuerpos contra V3 el suero de tres individuos infectados y encontraron que éstos juegan un papel más importante en la neutralización de cepas de laboratorio que en la de aislamientos primarios. En este estudio se empleó un ensayo de reducción del título viral y su principal limitación es el bajo número de sueros y aislamientos primarios utilizados.

Se ha detectado con baja frecuencia actividad neutralizante de AP en sueros de personas infectadas y en varios AcMs humanos (172). En relación con los AcMs contra V3 el primer reporte de neutralización de AP fue con el AcM 447D (173). En otro estudio realizado en varios laboratorios se ha reportado que el AcM 257-D neutralizó un aislamiento primario en tres de diez laboratorios en los cuales se evaluó, mientras el AcM TH1 sólo fue neutralizante en uno de diez laboratorios (172). Esto indica que existe un margen alarmante de variabilidad entre laboratorios para esta técnica. De acuerdo con los resultados reportados por Bou-Habib DC *et*

al. (174), la región V3 está poco expuesta en cepas primarias y esto las hace más resistentes a la neutralización.

Es muy interesante el hecho de que sólo anticuerpos humanos, ya sean monoclonales o policlonales, han mostrado la cualidad de neutralizar cepas primarias. Esto puede significar que la presentación natural de la gp120 en el virus es determinante, y hasta ahora no se ha conseguido mimetizar satisfactoriamente en los distintos inmunógenos evaluados en animales y en seres humanos. El significado biológico de estos resultados es objeto de amplia discusión actualmente. Recientemente se ha demostrado que las células activadas con mitógenos ("blastos"), usadas en este tipo de ensayo, son mucho más susceptibles a la infección con VIH que los linfocitos en reposo. La actividad neutralizante de sueros humanos frente a cepas primarias fue considerablemente mayor en un ensayo alternativo, en el cual las células no fueron activadas con fitohemaglutinina (PHA) (175). La capacidad de este ensayo para predecir la actividad *in vivo* de los anticuerpos ha sido puesta en entredicho cuando chimpancés inmunizados con gp120 resistieron un reto con esta cepa multiplicada en PBMC, aun cuando sus sueros no habían logrado neutralizar previamente la misma cepa *in vitro* (176).

Facilitación de la infección mediada por anticuerpos

Otro de los elementos que generan preocupación en torno a la respuesta humoral contra la envoltura del VIH es el reporte por varios autores de la facilitación de la infección mediada por anticuerpos (antibody dependent enhancement, ADE) (177, 178). Este proceso involucra los receptores de complemento y FC y tiene un efecto modesto en comparación al descrito para otros virus como el dengue. Sus posibles implicaciones *in vivo* aún están por demostrar. Estudios realizados con sueros de individuos vacunados con gp160 no han logrado demostrar actividad ADE (179).

Algunas regiones dentro de la envoltura viral se han definido como blanco de este tipo de anticuerpo (180, 181). Se ha reportado que anticuerpos contra V3 pueden mediar ADE en cepas divergentes (182, 183). Estos experimentos fueron realizados con péptidos que cubren toda la región V3 y es posible ofrecer dos hipótesis alternativas para explicar este resultado:

1. El fenómeno ADE es mediado por anticuerpos generados contra la base del lazo, que es muy conservada entre aislamientos y, los anticuerpos contra ella, no son neutralizantes. Esto presupone que existen epitopos de neutralización y epitopos de ADE y que éstos son excluyentes. Los AcMs 449D y 694/98D, dirigidos contra la región central del PND (Tabla 1), no median

ADE en ninguna de las condiciones estudiadas (61). El AcM 2.3a, dirigido contra un epitopo conformacional de gp120, muestra un débil efecto neutralizante en células H9 a altas concentraciones y efecto ADE en macrófagos en un amplio rango de concentraciones. Sin embargo el AcM 1.5e, fuertemente neutralizante contra otro epitopo conformacional, no muestra en ningún caso un efecto ADE (184, 185). La mezcla de ambos anticuerpos neutraliza a altas concentraciones y tiene efecto ADE a bajas concentraciones.

2. El efecto ADE es modulado por la afinidad de la interacción entre cada anticuerpo y su epitopo. Según ésta, dos anticuerpos contra el mismo epitopo pueden mediar funciones opuestas en dependencia de su afinidad. En este caso, los anticuerpos generados contra el V3 de una cepa muestran menos afinidad contra cepas divergentes y su efecto neutralizante se trueca en ADE.

Será necesario acumular más conocimientos sobre el mecanismo de ADE a nivel molecular para poder comprender cuál es su verdadero papel en la infección por VIH-1. Hasta el momento los expertos estiman que las evidencias encontradas no son suficientes como para invalidar los estudios clínicos efectuados actualmente con diversos candidatos vacunales.

Inmunoterapia pasiva con AcMs contra V3

Modelos animales. Diferentes modelos de inmunoterapia pasiva han demostrado la eficacia de anticuerpos contra V3 para proteger contra el reto viral *in vitro* e *in vivo*. El anticuerpo monoclonal BAT123 confirió protección en el modelo del ratón con Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID), repoblado con 20×10^6 células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas ante un reto con la cepa IIIIB. El reto se efectuó una hora después de administrada una dosis de 40 mg del AcM por kilogramo de peso. Según los estudios farmacocinéticos, esta cantidad garantizó una concentración en sangre de 100 µg/mL del AcM, el doble de la concentración necesaria para lograr neutralización completa *in vitro*. Se logró aislar VIH en cultivo de cinco de los seis controles y no se aisló en los doce ratones tratados. El tiempo de vida media del anticuerpo fue entre nueve y doce días (186).

Por otra parte, el AcM CB1, versión quimérica del 0.5β, logró proteger chimpancés del reto con VIH-1. La administración del AcM se efectuó tanto a una como a 24 h antes del reto. La dosis suministrada fue de 36 mg/kg de peso (187). Anteriormente se había comprobado que la incubación previa *in vitro* por 90 min del VIH-1 con anticuerpos policlonales contra gp120 evitaba la infección de chimpancés (188). En este mismo ensayo el AcM 0.5β no

protegió completamente, pero retardó significativamente la multiplicación del virus en el animal inoculado. Como este anticuerpo es murino existe la posibilidad de que los inmunocomplejos formados no fueran eliminados adecuadamente de la circulación y el virus conservara su potencialidad infectiva.

Los experimentos de protección en animales por transferencia pasiva de anticuerpos neutralizantes han constituido un elemento importante para la investigación en vacunas profilácticas. Constituyen hasta la fecha la única evidencia inequívoca de que un tipo definido de respuesta inmune logra proteger contra la infección del VIH-1, e indica además, que manteniendo un nivel determinado de anticuerpos en sangre es posible impedir la colonización irreversible del sistema inmune por el VIH-1.

Estudios clínicos en humanos. Estos resultados han alentado por una parte la búsqueda de anticuerpos de más amplia reactividad cruzada, o de una mezcla de AcM contra los principales grupos de VIH-1 para la inmunoterapia pasiva del SIDA. Existen dos situaciones donde este proceder puede ser claramente eficaz: la transmisión materno-fetal y la exposición accidental al virus. Más difícil es predecir si tendrá algún efecto beneficioso sobre el curso de la enfermedad en individuos infectados.

Los resultados de dos ensayos clínicos de Fase I en los que se emplearon el AcM murino P4D10 (189) y un AcM quimérico humano/ratón construido a partir del AcM BAT123 (190) (Tabla 1) mostraron que ambos fueron bien tolerados y seguros. Aunque estos ensayos de Fase I no están diseñados para evaluar la eficacia del tratamiento, en uno de éstos se encontró una disminución alentadora de la carga viral en algunos pacientes (190). Estos AcMs contra la cepa III B no son idóneos para el tratamiento por lo limitado de su reactividad contra las cepas de VIH más frecuentes. Este estudio brindó la posibilidad adicional de comprobar que la vida media en sangre de este AcM quimérico (ocho a dieciséis días) es muy superior a la descrita para un AcM murino (15 h) (191), aunque sigue siendo algo inferior a los 21 días reportados para la IgG normal (192).

Homologías y reactividad cruzada con proteínas humanas

Existen algunos reportes en la literatura de homologías entre la región V3 y proteínas humanas. En algunos casos ésta sólo existe a nivel de secuencia y en otros se ha evidenciado la presencia de anticuerpos con reactividad cruzada entre las moléculas homólogas. A continuación comentamos algunos de estos resultados.

Existe homología entre la región central de V3 de la cepa NY5 con colágeno (193) (Figura 2).

Los sueros de pacientes VIH+ reconocen tanto el péptido de V3-NY5 como el consenso de colágeno.

En este trabajo sólo se presentan los datos de un suero, aunque se plantea que se estudiaron dieciséis VIH+ y quince VIH-. No obstante al purificar los anticuerpos por inmunoadfinidad con el péptido NY5 la reactividad cruzada contra el péptido de colágeno en ELISA es muy reducida y poco convincente. Previamente se había sugerido que la presencia de anticuerpos contra colágeno en personas VIH negativas podía aumentar su susceptibilidad a la infección (194).

De forma similar existen epitopos compartidos entre el V3 de la cepa III B y proteínas de células nerviosas (195), así como con una proteína de 70 kD asociada al "splicing" de ARN (196), mientras que la reactividad con un antígeno nuclear parece ser la causa de la localización en núcleo de un AcM contra el aislamiento III B (197).

Por último la región que abarca el V3 y los diez aminoácidos precedentes tiene homología con la región variable pesada del grupo III de inmunoglobulinas humanas (198). Entre el 3 y 6 % de los linfocitos B de individuos VIH- reaccionan con gp120 y en los individuos con SIDA se observa un déficit clonal de células B con genes de la familia H3 (199). Estos elementos han servido para elaborar la hipótesis de que el V3 puede interferir con la red de regulación idiotípica del individuo y actuar como un superantígeno para células B que expresan VH3 (200, 201). De esa forma se estaría empobreciendo el repertorio de inmunoglobulinas del hospedero, lo cual facilitaría el escape del virus. Sin embargo, llama poderosamente la atención que la reactividad contra gp120 sea mediada por anticuerpos de clase IgM y no IgG (198), ya que se conoce que las IgM tienden a ser moléculas polirreactivas de baja afinidad y elevada avidéz. Por otra parte, un posible superantígeno ha sido localizado, pero no en V3 sino dentro de la región C2 de la gp120 (202).

Inmunidad Celular Contra V3

Epitopos para células T citotóxicas

En el mismo año en que fue descrito como epitopo B, Takahashi H *et al.* (203) reportaron la región V3 de la cepa III B como epitopo inmunodominante para células T citotóxicas (CTL) en ratones de haplotipo H2^d. El péptido reportado comprende la secuencia RIQRGPGRAVVTIGK de la cepa III B. Este hallazgo fue corroborado por diversos autores (204, 205).

Este péptido fue también reconocido por CTL de individuos seropositivos (206) y de voluntarios inmunizados con las proteínas de la envoltura (207,

Figura 2. Homologías en las secuencias de proteína del colágeno y el V3 de la cepa NY5.

EKGEAGDPGRPGD
*KG**G*PGR***
KKGIAIGPGR TLY

Cadena $\alpha 1$ del colágeno humano tipo VI
Consenso de colágenos homólogos
V3 NY5

208). En estos últimos se ha descrito reconocimiento restringido por los alelos HLA-A2, HLA-A3 y HLA-A11.

Takahashi H *et al.* (209, 210) reportaron por primera vez la existencia de células CD4+ con actividad citotóxica en voluntarios inmunizados. También se detectó actividad citotóxica tanto en linfocitos CD4+ como CD8+ en tres de ocho individuos inmunizados con conjugado V3MN-PPD (9) y se vinculó a la presencia del alelo HLA-B7. Una asociación de este tipo había sido reportada previamente en casos de seroconversión aguda (211).

La variación de la región V3 puede también generar variantes de escape para células CTL (212, 213), aunque también se ha descrito la posibilidad de activar clones de CTL polirreactivos contra varias cepas virales (214).

Epitopos para células T auxiliaoras

Diferentes estudios han demostrado que péptidos de V3 pueden ser presentados también por los antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad de Clase II para activar clones de células T auxiliaoras (Th) tanto en ratones (204, 206, 215, 216), como en personas infectadas (217), y voluntarios sanos vacunados con gp120 (218). No obstante, no se detectó actividad linfoproliferativa frente al péptido de 24 aminoácidos de V3-III_B (N N T R K S I R I Q R G P G R A F V T I G K I G) en cinco voluntarios vacunados con gp120 III_B producida en baculovirus y adyuvada con alúmina (219).

El V3 como candidato vacunal

Estrategias vacunales

El principal elemento en contra de una vacuna basada exclusivamente en el PND es el elevado polimorfismo de esta región que genera principalmente anticuerpos tipo específicos (34, 37, 92). Antisueros generados contra un aislamiento viral muestran actividad neutralizante contra la cepa homóloga, pero generalmente no son capaces de neutralizar cepas heterólogas que divergen en la secuencia de V3 (83).

A pesar de esto, y debido a sus excepcionales propiedades como inmunógeno, diferentes laboratorios han centrado su estrategia vacunal en la región V3. Se han ensayado diferentes formas de presentación con el propósito de incrementar la inmunogenicidad y lograr títulos altos de anticuerpos neutralizantes.

A continuación resumimos algunas de las estrategias usadas:

Péptidos cíclicos

Se han ensayado diferentes variantes de ciclización de péptidos de V3. Chimpancés inmunizados con

mezclas de 21 péptidos cíclicos de la región V3 completa de diferentes cepas desarrollaron anticuerpos contra todos los péptidos, con títulos superiores a 1/25 000 en seis de siete animales (220). Se observó que la respuesta contra gp120 nativa y los títulos neutralizantes fueron superiores en los animales que habían sido previamente inoculados con gp120. En este caso la estructura cíclica se logró en condiciones de oxidación por formación de puente disulfuro entre las dos cisteínas. También se han ensayado otras vías de ciclizar el péptido buscando una estructura más cercana a la de la molécula nativa sin lograr mejoras apreciables (221).

Péptidos híbridos T-B

Diferentes experimentos han mostrado la factibilidad de generar anticuerpos neutralizantes contra más de un aislamiento viral a través de la combinación de dos o más péptidos, o el empleo de péptidos híbridos (222, 223). Un considerable esfuerzo se ha dirigido a desarrollar un inmunógeno peptídico definido, que no necesite de proteínas transportadoras. Varios reportes han demostrado que péptidos híbridos, con un contenido de alrededor de quince aminoácidos de la región central del V3 y un epitopo para células T auxiliaoras, generan una respuesta de anticuerpos neutralizantes en varias especies (224, 225). La disposición relativa de los epitopos T y B en estas moléculas parece ser importante en su inmunogenicidad, aunque los resultados en este sentido han sido contradictorios. Algunos autores sugieren que, más que la polaridad del péptido, la conservación de los sitios internos de procesamiento proteolítico es el factor que determina su inmunogenicidad.

Péptidos multiantigénicos

La misma idea ha sido extrapolada al sistema conocido como MAPS, del inglés "Multi Antigenic Peptide System", el cual consiste en un núcleo de lisinas del cual se derivan cuatro o más ramas compuestas por los péptidos de interés. MAPS divalentes con péptidos de V3 y péptidos T fueron más eficientes en generar respuesta neutralizante en ratones y cobayos que MAPS monovalentes (226). La inmunogenicidad en conejos fue elevada para ambas moléculas. No obstante, estudios comparativos con péptidos lineales o cíclicos, no han encontrado ventajas significativas para este sistema (227).

Péptidos conjugados a proteínas "carriers"

Varias proteínas han sido empleadas como "carrier" de péptidos de V3. Para esto se han empleado métodos químicos de conjugación como glutaraldehído (9) o carbodiimida (228).

Cryz SJ *et al.* (228) inmunizaron con trece aminoácidos de V3 de la cepa MN acoplados a la toxina

de *Pseudomona aureoginosa*. Este inmunógeno neró títulos de anticuerpos (1:1 000 en ELISA) en bayos inmunizados con cuatro dosis sin adyuvan-

Los sueros de estos animales neutralizaron al N (1:750) pero solo con bajos títulos las cepas B y RF. Por otra parte, se describió una fuerte actividad cruzada en ELISA contra un péptido de cepa SC y el péptido repetitivo (GPGRAF)₃, jentras que ésta fue muy débil con RF, NY5 y DC-42.

Por último, otro enfoque interesante consiste en la presentación de péptidos del V3 acoplados a alfa₂ microglobulina para lograr un transporte dirigido hasta el receptor de esta molécula en monocitos (229). Se demostró que el uso de este sistema es superior a la adyuvación de los péptidos directamente con adyuvante de Freund.

Lipopéptidos

El empleo de lipopéptidos tiene, en teoría, la ventaja de facilitar la presentación de epitopos T por las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad y potenciar de esta forma la activación de células T citotóxicas. La racionalidad de su empleo estriba en la facilidad del componente lipídico para mediar la introducción del péptido en el citoplasma celular y propiciar su interacción con las moléculas de clase I. Se ha descrito la inducción de anticuerpos neutralizantes y respuesta citotóxica en cobayos utilizando MAPS de V3 acoplados a tripalmitoil-S gliceril cisteína sin el empleo de adyuvantes (230). Las ventajas de este sistema en comparación con otras vías de inducir respuesta humoral y celular están aún por demostrar.

Polipéptidos multiepitópicos

Otra forma de presentación de la región V3 al sistema inmune son los polipéptidos multiepitópicos (PMEs). Éstos son proteínas quiméricas que contienen varias regiones V3 separadas entre sí por secuencias espaciadoras.

A través de la síntesis química del gen y su clonación en un plasmidio de expresión fusionado a un fragmento de la IL2 humana se obtuvo un primer PME que contiene la región central de V3 de las cepas MN, SC y WMJII (60). Esta proteína fue capaz de inducir anticuerpos monoclonales neutralizantes para la cepa MN.

En estudios más recientes se han generado variantes de PMEs con seis regiones V3 y se ha comprobado la capacidad de inducir altos títulos de anticuerpos contra todos los péptidos incluidos y con actividad neutralizante en conejos contra las cepas MN y LAI (231). A pesar de que el diseño de estos PMEs no está basado en consideraciones estructurales, los epitopos incluidos quedan bien expuestos y son reconocidos por AcMs específicos.

Esta estrategia tiene las siguientes ventajas y desventajas en relación con el uso de péptidos sintéticos:

Ventajas

- Inmunógeno bien definido con mayor potencial inmunogénico que los sintéticos péptidos sin necesidad del uso de "carriers".
- Posibilita la clonación del gen en un vector vivo.
- Permite la inmunización con ADN desnudo.

Desventajas

- Ofrece menos facilidades para adaptar la estrategia de vacunación frente a cambios en la epidemiología molecular del VIH.

Inserción de V3 en proteínas recombinantes

Wagner *et al.* (232) insertaron la región V3 en diferentes posiciones del gen gag y lo clonaron en el virus Vaccinia. La proteína recombinante expresada tanto en células CV1 como en células de insectos, mantuvo la capacidad de autoensamblarse y formar partículas parecidas a virus ("virus-like-particles", VLP). Estas VLP expusieron la región V3 hacia la superficie, donde fue reconocida por el 90 % de los sueros humanos VIH-1 positivos. Luo LZ *et al.* (233) insertaron la región V3 en un fragmento de 41 kD de la proteína precursora de la cápsida. Sueros de conejos inmunizados con este producto reconocieron la gp120 y mostraron actividad neutralizante. Una estrategia análoga se siguió con la inserción de V3 en el retrotransposon Ty de levaduras, capaz de formar VLP (215).

Anticuerpos anti-idiotípicos

Se han generado AcMs que reconocen el idiotipo de AcM anti V3 (anti-idiotípicos, AI) y se ha logrado demostrar que mimetizan la región V3 y que son capaces de generar anticuerpos neutralizantes en conejos (234) y ratones (235). Esta estrategia en general tiene la desventaja de la baja inmunogenicidad de estas moléculas. En el caso específico de los modelos de V3 empleados, éstos son AcMs tipo específicos, y por consiguiente, sólo mimetizan un número limitado de variantes de V3, y generan una respuesta de espectro estrecho. Uno de los AcMs contra las regiones conservadas (GPGR) podría generar un AI más universal, pero parece más atractivo emplear AcMs contra otros epitopos conformacionales más conservados incluso entre diferentes subtipos (236).

Otras variantes

Una estrategia original ha sido la síntesis de péptidos repetitivos en los cuales secuencias de V3 se insertan en regiones de la mucina humana MUC1 (237). Esta proteína se utilizó para aportar un marco adecuado para la exposición de la región V3. Estu-

dios previos indicaban que MUC1 presenta un motivo estructural que garantiza la correcta exposición de las regiones inmunodominantes. Empleando técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR), se demostró que los fragmentos de V3 insertados estaban correctamente expuestos, y consecuentemente fueron reconocidos por sueros humanos y anticuerpos monoclonales específicos.

Respuesta de voluntarios sanos vacunados con péptidos de V3

Algunas variantes con péptidos de V3 se encuentran ya en ensayos clínicos de Fase I en humanos.

United Biomedical Inc. (UBI) realizó un primer ensayo clínico de Fase I donde se evaluaron tres dosis de un MAP con la cepa MN adyuvado con Al(OH)₃. La inmunogenicidad y los títulos neutralizantes fueron mayores en la dosis más alta de 500 µg. En todos los voluntarios se detectaron títulos contra el péptido por ELISA después de tres inmunizaciones y actividad neutralizante en ocho de los diez vacunados (238).

Esta compañía tiene otro protocolo clínico en curso con una mezcla de quince MAPS con péptidos de cinco subtipos diferentes. Está por demostrar si es posible lograr títulos neutralizantes contra este inmunógeno en el que cada uno de los V3 está mucho menos representado.

En otro ensayo clínico se utilizó un péptido de V3 conjugado a Derivados Proteicos Purificados (PPD) de BCG por el Instituto Suizo de Sueros y Vacunas. Con cinco dosis de solo 640 µg de péptido de quince aminoácidos de MN conjugado a PPD sin adyuvante, se logró generar títulos neutralizantes entre 20 y

200 en ocho voluntarios sanos (9). También se encontró reactividad cruzada en ELISA con SC pero no con IIB ni RF. Se especula que la existencia de una respuesta de memoria previa contra PPD es responsable de la amplificación de la respuesta contra el péptido.

Una combinación de péptidos de V3 de las cepas LAI, MN y RF conjugados a hemocianina de "keyhole limpet" (KLH) fue empleado por investigadores de la Universidad de Yokohama (12).

Por último un péptido de V3 (MN) se empleó en un ensayo clínico por Pasteur Merieux después de dos dosis con gp160 recombinante (239). Este esquema de inmunización indujo altos títulos de anticuerpos neutralizantes pero restringidos a la cepa de VIH homóloga.

En general, estos inmunógenos, al igual que otros evaluados en Fase I, han demostrado ser bien tolerados y seguros en humanos. En cuanto a la respuesta inmune observada, hasta el momento se ha comprobado la capacidad de despertar anticuerpos neutralizantes de la cepa homóloga en la mayoría de los vacunados, si bien éstos han sido discretos. Están aún por evaluar las estrategias más ambiciosas que se proponen generar una respuesta amplia contra diversos tipos de VIH-1. Aun cuando la información disponible no permite concluir que un preparado vacunal basado solamente en la región V3 sea suficiente para brindar protección, se espera que al menos su combinación con otros inmunógenos sea muy positiva. Dada la situación crítica de los modelos animales en SIDA, sólo la conducción de pruebas de eficacia en humanos darán una respuesta satisfactoria a esta interrogante.

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871.

2. Popovic M, Sarngandharan MG, Read E, Gallo RC. Detection isolation and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre AIDS. *Science* 1984; 224: 497-500.

3. UNAIDS. The Global Status and Trends of the Global HIV/AIDS Pandemic, Final Report, July 1996.

4. Derosiers RC. HIV with multiply gene deletions as a life attenuated vaccine for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 411-421.

5. Keefer MC, Graham BS, Belshie R, Schwartz D, Corey L, Bolognesi DP *et al.* Studies of high doses of a human immunodeficiency virus type 1 recombinant glycoprotein 160 candidate vaccine in HIV type 1 seronegative individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(12): 1713-1723.

6. Kiemy MP, Rautmann G, Schmitt D, Dott K, Wain-Hobson S, Alizon M *et al.*

AIDS virus env protein expressed from a recombinant vaccinia virus. Biotechnology 1986; 4: 790-795.

7. Stover CK, de la Cruz V, Fuerst TR *et al.* New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991; 351: 456-460.

8. Pialoux G, Excler JL, Riviere Y, González-Canali G, Feuillie V, Coulaud P *et al.* A prime boost approach to HIV preventive vaccine using a recombinant canary pox virus expressing gp160 (MN) followed by a recombinant glycoprotein 160 (MN/LAI). *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 373-381.

9. Rubinstein A, Goldstein H, Pettoello-Mantovani M, Mizrahi Y, Bloom B, Furer E *et al.* Safety and immunogenicity of a V3 loop synthetic peptide conjugated to purified protein derivative in HIV-seronegative volunteers. *AIDS* 1995; 9: 243-251.

10. Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan M, Dang K, Refali Y *et al.* Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4156-4160.

11. Coney L, Wang B, Ugen KE, Boyer

J, McCallus D, Srikantan V *et al.* Facilitated DNA inoculation induces anti HIV-1 immunity in vivo. *Vaccine* 1994; 12(16): 1545-1550.

12. Fast PE, Walker MC. Human trials of experimental AIDS vaccines. *AIDS* 1993; 7, (suppl. 1): 147.

13. Esparza J, Heyward WL, Osmanov S. HIV vaccine development: from basic research to human trials. *AIDS* 1996; 10 (suppl. A): S123-S132.

14. Hoff R, McNamara J, Fowler MG, McCauley M. HIV vaccine development and clinical trials. *Acta Paediatr* 1994; (suppl.) 400: 73-3.

15. Papsidero LD, Sheu M, Ruscetti FW. human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. *J Virol* 1989; 63: 267-272.

16. Chanh TC, Dreesman GR, Kanda P, Linette GP, Sparrow JT, Ho DD *et al.* Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *EMBO J* 1986; 5: 3065-3071.

17. Broliden PA, von Gegerfelt A, Clapham P, Rosen J, Fenyo EM, Wha-

- ren B *et al.* Identification of human neutralization-inducing regions of HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 461-465.
18. Vella C, Ferguson M, Dunn G, Melen R, Langedijk H, Evans D *et al.* Characterization and primary structure of a human immunodeficiency virus type 1/HIV-1 neutralization domain as presented by a poliovirus type 1/HIV-1 chimera. *J Gen Virol* 1993; 74: 2603-2607.
19. Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G *et al.* A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; 67: 6642-6647.
20. Gnann JW, Nelson JA, Oldstone MBA. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1987; 156: 261-267.
21. Ho D, Kaplan JC, Rackausas I, Gurney ME. Second conserved domain is important for HIV infectivity and antibody neutralization. *Science* 1988; 239: 1021-1023.
22. Vahlne A, Horal P, Eriksson K, Jeansson S, Rymo L, Hødström KG *et al.* Immunizations of monkeys with synthetic peptides disclose conserved areas on gp120 of human immunodeficiency virus type 1 associated with cross-neutralizing antibodies and T cell recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10744-10748.
23. Ronco J, Charbit A, Dedieu JF, Mancini M, Michel ML, Henin I *et al.* Is there a neutralization epitope in the second conserved domain of HIV-1 envelope protein? *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7(1): 1-3.
24. Neurath R, Strick N. Confronting the hypervariability of an immunodominant epitope eliciting virus neutralizing antibodies from the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Mol Immunol* 1990; 27: 539-549.
25. Fung MSC, Sun CRY, Gordon WL, Liou RS, Chang TW, Sun WNC *et al.* Identification and characterization of a neutralization site within the second variable region of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 1992; 66: 848-856.
26. Sun N, Ho D, Sun C, Liou R, Gordon W, Fung M *et al.* Generation and characterization of monoclonal antibodies to the putative CD4 binding domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 1989; 63: 3579-3585.
27. Neurath R, Strick N, Lee ES. B-cell epitope mapping of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins with long (19-36 residues) synthetic peptides. *J Gen Virol* 1990; 71: 85-95.
28. Ho D, Fung MSC, Yoshiyama H, Cao Y, Robinson J. Discontinuous epitopes on gp120 important in HIV-1 neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(8): 1337-1339.
29. Roben P, Moore J, Thali M, Sodroski J, Barbas C, Burton D. Recognition of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize HIV 1. *J Virol* 1994; 68(8): 4821-4828.
30. Steimer K, Scandella CJ, Skites PV, Haigwood N. Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to gp120. *Science* 1991; 253: 1-4.
31. Moore JP, Ho D. Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 are highly prevalent in sera of infected humans. *J Virol* 1993; 67(2): 863-875.
32. Modrow S, Hahn B, Shaw GM, Gallo RC, Staal F, Wolf H. Computer-assisted analysis of envelope protein of seven human immunodeficiency virus isolates. Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* 1987; 61: 570-578.
33. Palker TJ, Clark M, Langlois AJ, Mathews TJ, Weinhold KJ, Randall RR *et al.* Type specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1932-1936.
34. Rusche JR, Javaherian K, McDaniel C, Petro J, Lynn DL, Grimaila R *et al.* Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of viral envelope gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3192-3202.
35. Goudsmit J, Debouck C, Melen RH, Smith L, Bakker M, Asher DM *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988(a); 85: 4478-4482.
36. Putney S, Javaherian K, Profy A, Emini E, Langlois A, Ross K *et al.* In: *Hum Retroviruses* 1990; 323-335, Edited by Alan R. Liss.
37. Javaherian K, Langlois AJ, McDaniel C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL *et al.* Principal neutralizing domain of the HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6768-6772.
38. Putney S, Javaherian K, Rusche J, Matthews T, Bolognesi D. Features of the HIV envelope and development of a subunit vaccine in *AIDS Vaccine Research and Clinical Trials*, Eds. Putney S and Bolognesi D. Marcel Dekker, New York, 1990; 3-61.
39. Goudsmit J, Boucher AB, Melen RH, Epstein LG, Smit L, Hoek *et al.* Immunodominant B-cell epitopes of HIV-1 envelope recognized by infected and immunized host. *AIDS* 1988(b); 2: 157-164.
40. Laman JD, Schellekens MM, Lewis GK, Moore JP, Matthews TJ, Langedijk JP *et al.* A hidden region in the third variable domain of HIV-1 IIB gp120 identified by a monoclonal antibody. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9(7): 605-612.
41. La Rosa GJ, Davide JP, Weinhold K, Waterbury J, Profy AT, Lewis JA *et al.* Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 1990; 249: 932-935.
42. Chandrasekhar K, Profy AT, Dyson HJ. Solution conformational preferences of immunogenic peptides derived from the principal neutralizing determinant of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Biochemistry* 1991; 30: 9187-9194.
43. Vranken WF, Budesinsky M, Fant F, Boulez K, Borremans FAM. The complete consensus V3 loop peptide of the envelope protein gp120 of HIV-1 shows pronounced helical character in solution. *FEBS Letters* 1995; 374: 117-121.
44. Wilson I, Stanfield R, Ghiara J, Stura E, Sattarthroat A, Profy A. Structural basis for recognition of HIV-1 by two broadly neutralizing monoclonal antibodies. *IVth Int Conf AIDS, Berlin, 1993, WS-A21-1, Abstract Book* 1: 37.
45. Ghiara J, Stura E, Stanfield R, Profy A, Wilson I. Crystal structure of the Principal Neutralization Site of HIV-1. *Science* 1994; 264: 82-85.
46. Matsushita S, Robert-Guroff M, Rusche J, Koito A, Hattori T, Javaherian K *et al.* Characterization of a human immunodeficiency virus Neutralizing Monoclonal Antibody and Mapping of the Neutralizing Epitope. *J Virol* 1988; 62(6): 2107-2114.
47. Skinner MA, Ting R, Langlois AL, Weinhold KJ, Lyerly HK, Javaherian K *et al.* Characteristics of a neutralizing monoclonal antibody to the HIV envelope glycoprotein. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1988; 4(3): 87-197.
48. Liou RS, Rosen EM, Fung MSC, Sun WNC, Sun C, Gordon W *et al.* A chimeric mouse-human antibody that retains specificity for HIV gp120 and mediates the lysis of HIV-infected cells. *J Immunol* 1989; 143: 3967-3975.
49. Broliden PA, Ljunggren K, Hinkula J, Norrby E, Akerblom L, Wahren B. A monoclonal antibody to human immunodeficiency virus type 1 which mediates cellular cytotoxicity and neutralization. *J Virol* 1990; 64: 2.
50. Scott CF, Silver S, Profy AT, Putney SD, Langlois A, Weinhold K *et al.* Human monoclonal antibody that recognized the V3 region of human immunodeficiency virus gp120 and neutralizes the human T-lymphotropic virus type III MN strain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 8: 8596-8601.
51. Durda PJ, Bachelor L, Clapham P, Janoski AM, Loebe B, Matthews TJ *et al.* HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies induced by a synthetic peptide. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; 6(9): 1115-1213.

52. Moore JP, McKutchan FE, Poon SW, Mascola J, Liu J, Cao Y *et al.* Exploration of antigenic variation in gp120 from clades A through F of human immunodeficiency virus type 1 by using monoclonal antibodies. *J Virol* 1994; 68(12): 8350-8364.
53. Robinson JE, Yoshijima H, Holton D, Elliot S, Ho D. Distinct antigenic sites on HIV gp120 identified by a panel of human monoclonal antibodies. *J Cell Biochem* 1992; (suppl.)16E: 71.
54. Ohno T, Terada M, Yoneda Y, Shea KW, Chambers RF, Stroka DM *et al.* A broadly neutralizing monoclonal antibody that recognizes the V3 region of HIV-1 glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10726-10729.
55. Gorny MK, Xu JY, Gianakos V, Karwowska S, Williams C, Sheppard HW *et al.* Production of site selected neutralizing antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3238-3242.
56. Buchbinder A, Karwowska S, Gorny MK, Burda ST, Zolla-Pazner S. Synergy between human monoclonal antibodies to HIV extends their effective biologic activity against homologous and divergent strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(4): 425-427.
57. Barbas C, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cabada D, Jones TM *et al.* Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9339-9343.
58. Pal R, Di Marzo Veronese F, Nair BC, Rahman R, Hoke R *et al.* Characterization of a neutralizing monoclonal antibody to the external glycoprotein of HIV-1. *Intervirology* 1992; 86: 86-93.
59. White-Scharf ME, Potts B, Smith LM, Sokolowski KA, Rusche JR, Silver S. Broadly neutralizing monoclonal antibodies to the V3 region of HIV-1 can be elicited by peptide immunization. *Virology* 1993; 192: 197-205.
60. Duarte CA, Montero M, Seralena A, Valdés R, Jiménez V, Benítez J *et al.* Multiepitope polypeptide of the HIV-1 envelope induces monoclonal antibodies against V3 loop. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(3): 235-243.
61. Forthal DN, Landucci G, Gorny M, Zolla-Pazner S, Robinson WE. Functional activities of 20 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) specific human monoclonal antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(9): 1095-1099.
62. Nara P, Smet L, Dunlop N, Hatch W, Merges M, Waters D *et al.* Emergence of resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental HIV-1 III-B infection of chimpanzees. *J Virol* 1990; 64: 3779.
63. Willey R, Ross E, Buckler-White A, Theodore T, Martin M. Functional interaction of constant and variable domains of HIV-1 gp120. *J Virol* 1989; 63: 3595-3600.
64. Neurath AR, Strick N, Jiang S. Synthetic peptides and anti-peptide antibodies as probes to study interdomain interactions involved in virus assembly: The envelope of the HIV-1. *Virology* 1992; 188: 1-13.
65. Robert-Guroff M, Louie A, Myagkikh, Michaels F, Kiény MP, White-Scharf ME, Potts B, Groog D, Ritz MS. Alteration of the V3 loop context within the envelope of Human Immunodeficiency Virus type 1 enhances neutralization. *J Virol* 1994; 68(6): 3459-3466.
66. Luciw P, Shacklett BL. Molecular biology of the human immunodeficiency viruses. In *HIV Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment*, 1993 Eds Morrow WJW and Haigwood NL. Elsevier Science Publishers.
67. Ho D, Neuman AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz. Rapid turn-over of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-126.
68. Wei X, Ghosh SK, Johnson VA, Emini E, Deutsch P, Lifson JD *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373: 117-122.
69. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starich B, Josephs S *et al.* Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985; 313: 277.
70. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith R, Pavlakis GN (eds). *Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of nucleic acid and amino acid sequences*, 1993. Theoretical Biology and Biophysics Group T-10, Mail Stop K710, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico 87545, USA.
71. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith R, Pavlakis GN (eds). *Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of nucleic acid and amino acid sequences*, 1994. Theoretical Biology and Biophysics Group T-10, Mail Stop K710, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico 87545, USA.
72. Rolo FM, Miranda L, Wainberg MA, Gu ZX, Lobaina L, Noa E, Mato J *et al.* Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. *J Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 1995; 9(2): 123-125.
73. Gómez C, Fernández JR, Iglesias E, López AE, Lobaina L, Noa E *et al.* Complete DNA sequence of the gene coding for the external glycoprotein (gp120) from a Cuban HIV-1 isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12(6): 553-555.
74. Balfe P, Simmonds O, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJL. Concurrent evolution of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *J Virol* 1990; 64: 6221-6233.
75. Nowak MA, Anderson RM, McLean AR, Wolfs TFW, Goudsmit J, May RM. Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS. *Science* 1991; 254: 963-969.
76. McNearny Y, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A *et al.* Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10247-1251.
77. De Wolf TFW, de Jong JJ, van der Berg H, Tunagel JMH, Krone WJA, Goudsmit J. Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of human immunodeficiency virus 1 in host dependent, rapid and continuous. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 9938-9942.
78. Michael N, Davis KE, Loomis-Price LD, VanCott TC, Burke DS, Redfield RR *et al.* V3 seroreactivity and sequence variation: tracking the emergence of V3 genotypic variation in HIV-1 infected patients. *AIDS* 1996; 10: 121-129.
79. Watkins B, Ritz M, Wilson C, Aldrich K, Davis A, Robert-Guroff M. Immune escape by human immunodeficiency virus type 1 from neutralizing antibodies: Evidence for multiple pathways. *J Virol* 1993; 67(12): 7493-7500.
80. Nara PL, Smit L, Dunlop N, Hatch W, Merges M, Waters D *et al.* Evidence for rapid selection and deletion of HIV-1 subpopulations *in vivo* by V3 specific neutralizing antibody: a model of humoral-associated selection. *Dev Biol Stand* 1990; 72: 315-341.
81. Kuiken CL, Lukasov V, Baan E, Dekker J, Leunissen JAM, Goudsmit J. Evidence for limited within person evolution of the V3 domain of the HIV-1 envelope in the Amsterdam population. *AIDS* 1995; 10: 31-37.
82. Carrow EN, Vujcic LK, Glass WL, Seamon KB, Rastog SC, Hendry RM *et al.* High prevalence of antibodies to the gp120 V3 region principal neutralizing determinant of HIV-1 MN in sera from Africa and the Americas. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7(10): 831-838.
83. Baillou A, Brand D, Denis F, Boup SM, Chout R, Goudeau A *et al.* High antigenic cross-reactivity of the V3 consensus sequences of HIV-1 gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9(12): 1209-1215.
84. Cheingsong-Popov R, Lister S, Callow D, Kaleebu P, Beddows S, Weber J *et al.* Serotyping HIV type 1 by antibody binding to the V3 loop. Relationship to viral genotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(11): 1379-1386.
85. López-Campistrous AE, Reyes O, Garay H, Díaz H, Duarte CA. Antibodies against HIV-1 V3 loop synthetic peptides in the plasma of Cuban seropositives recognize more frequently African sequences and are inversely related to disease progression. Sent to AIDS for publication.

86. Sherefa K, Sallberg M, Sonnerborg A. Evidence of no change in V3 loop antibody recognition pattern in HIV type 1-infected Ethiopians between 1988 and 1993. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(11): 1551-1556.
87. Holmback K, Kusk P, Hulgaard EF, Bugge TH, Scheibel E *et al.* Autologous antibody response against the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 isolated from infected humans. *J Virol* 1993; 67(3): 1612-1619.
88. Pau CP, Lee-Thomas S, Auwanit W, George JR, Ou CY, Parekh BS *et al.* Highly specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS* 1993; 7: 337-340.
89. Wasi C, Herring B, Raktham S, Vanichsen, Mastro TD, Young NL *et al.* Determination of HIV subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand using peptide enzyme immunoassay and the heteroduplex mobility assay: Evidence of increasing infection with HIV-1 subtype E. *AIDS* 1995; 9(8): 843-851.
90. Cheingsong-Popov R, Lister S, Callow D, Kaleebu P, Boddows S, Weber J *et al.* Serotyping HIV type 1 by antibody binding to the V3 loop. Relationship to viral genotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(11): 1379-1386.
91. Pau CP, Kai M, Holloman-Candal DL, Luo CC, Kalish M, Schochetman G *et al.* Antigenic variation and serotyping of HIV type 1 from four World Health Organization-sponsored HIV vaccine sites. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(11): 1369-1377.
92. Zwart G, Langedijk H, van der Hoek L, de Jong JJ, Wolfs TF, Ramaurtasing C *et al.* Immunodominance and antigenic variation of the principal neutralization domain of HIV-1. *Virology* 1991; 181: 481-489.
93. Nara P, Goudsmit J. Clonal dominance of the neutralizing response to the HIV-1 V3 epitope: evidence for "Original Antigenic Sin" during vaccination and infection in animals, including humans. *Vaccines* 1991; 9(1). Cold Spring Harbor Lab press. 0-87969-367-391.
94. Fenouillet E, Blanes N, Benjuad A, Gluckman JC. Anti-V3 antibody reactivity correlates with clinical stage of HIV-1 infection and with serum neutralizing activity. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 419-424.
95. Rossi P, Moschese V, Broliden PA, Fundaro C, Quinti I, Plebani A *et al.* Presence of maternal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 epitopes correlates with the uninfected status of children born to seropositive mothers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8055-8058.
96. Devash Y, Clavelli A, Wood K, Reagan KJ, Rubinstein A. Vertical transmission of human Immunodeficiency Virus is correlated with the absence of high-affinity/avidity maternal antibodies to the gp120 principal neutralizing determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3445-3449.
97. Parekh BS, Shaffer MN, Pau CP, Abrams E, Thomas EP, Pollack H *et al.* Lack of correlation between maternal antibodies to V3 peptides of gp120 and perinatal HIV-1 transmission. *AIDS* 1992; 5: 1179-1184.
98. Halsey NA, Markham R, Wahren B, Boulos R, Rossi P, Wigzell H. Lack of association between maternal antibodies to the V3 loop peptides and maternal-infant HIV-1 transmission. *J Acquired Immune Deficiency Syndrome* 1992; 5: 153-157.
99. Rubinstein A, Goldstein H, Calvelli T, Devash Y, Rubinstein R, Soeiro R *et al.* Maternofetal transmission of human immunodeficiency virus-1: The role of antibodies to the V3 primary neutralizing domain. *Pediatric Research* 1992; 33(1): 76-79.
100. Moore JP. The reactivities of HIV-1+ human sera with solid phase V3 loop peptides can be poor predictors of their reactivities with the V3 loops on native gp120 molecules. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9(3): 209-218.
101. Tschacher E, Buchow H, Gallo RC, Reitz MS. Functional contribution of cysteine residues to the human immunodeficiency virus type 1 envelope. *J Virol* 1990; 64: 2250-2259.
102. Freed EO, Myers DJ, Risser R. Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J Virol* 1991; 65: 190-194.
103. Chiou SH, Freed EO, Paganiban AT, Keneally WR. Studies on the role of the V3 region in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein function. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(9): 1611-1617.
104. Bergeron L, Sullivan N, Sodrowski J. Target cell specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable region and gp41 amino terminus. *J Virol* 1992; 66(4): 2389-2397.
105. Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, ChunGoh T, Terwillinger E *et al.* Functional regions of the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1. *Science* 1987; 237: 1351-1355.
106. Helseth E, Kowalski M, Gabudza D, Olshevsky U, Haseltine D, Sodrowski J. Rapid complementation assays measuring replicative potential of HIV-1 envelope glycoprotein mutants. *J Virol* 1990; 64: 2416-2420.
107. Freed EO, Myers DJ, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4650-4654.
108. Freed EO, Risser R. Identification of conserved residues in the human immunodeficiency virus type 1 PND that are involved in fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7(10): 807-811.
109. Ivanoff L, Looney D, McDanal C, Morris J, Wong-Staal F, Langlois A *et al.* Alteration of HIV-1 infectivity and neutralization by a single amino acid replacement in the V3 loop domain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7(7): 595-603.
110. Page KA, Stearns S, Littman D. Analysis of mutations in the V3 domain of gp120 that affect fusion and infectivity. *J Virol* 1992; 66(1): 524-533.
111. Schulz T, Reeves JD, Head JG, Taylor C, Stephens P, Clements G, *et al.* Effect of mutations in the V3 loop of HIV-1 gp120 on infectivity and susceptibility to proteolytic cleavage. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9(2): 159-166.
112. Tersmette M, Lange JMA, de Goede REY, de Wolf F, Eeftink Schattenkerk JKM, Schellekens PTA *et al.* Association between biological properties of human immunodeficiency virus type 1 variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989; 1: 983-985.
113. Gruters RA, Terpstra FG, de Goede REY, Mulder JW, de Wolf F, Schellekens PTA, van Lier RAW *et al.* Immunologic and virologic markers in individuals progressing to AIDS. *AIDS* 1991; 5: 837-844.
114. Shuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Derckson MW, de Goede RY, Steenwijk RP *et al.* Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: Progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell tropic virus populations. *Virology* 1992; 66: 1354-1360.
115. Koot M, Keet IPM, Vos AHV, de Goede REY, Roos MTL, Coutinho RA *et al.* Prognostic value of HIV-1 syncytium inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993; 118: 681-688.
116. de Jong JJ, de Ronde A, Keulan W, Tersmette M, Goudsmit J. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* 1992; 66(11): 6777-6780.
117. Callahan L. HIV-1 virion-cell interactions: An electrostatic model of pathogenicity and syncytium formation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(3): 231-233.
118. Callahan LN, Phelan P, Mallinson M, Norcross MA. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions. *J Virol* 1991; 65: 581.
119. Patel M, Yanagishita M, Roderiquez G, Bou-Habib DC, Oravec T, Hascall VC and Norcross MA: Cell surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 167-174.

120. Mbemba E, Czyski JA, Gattegno L. The interaction of a glycosaminoglycan, Heparin with HIV-1 major envelope glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992; 1180(2): 123-129.
121. Fouchier RAM, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F *et al.* Phenotype associated sequence variation in the third variable region of the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9434-9438.
122. Cheng-Mayer C, Shioda T, Levy JA. Host range, replicative and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in Tat and gp120. *J Virol* 1991; 65: 6931-6941.
123. Kuiken VI, de Jong J, Baan E, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype. *J Virol* 1992; 66: 4622-4627.
124. Grimaila RJ, Fuller BA, Rennett PD, Nelson MB, Hammarskjöld ML, Poits B *et al.* Mutations in the principal neutralization determinant of the human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics and neutralization. *J Virol* 1992; 66: 1875-1883.
125. Conner RI, Notermans DW, Mohri H, Cao Y, Ho DD. Biological cloning of functionally diverse quasi-species of HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 541-546.
126. Oka S, Ida S, Shioda T, Takebe Y, Kobayashi N, Shibuya Y *et al.* Genetic analysis of HIV-1 during rapid progression to AIDS in an apparently healthy man. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(3): 271-277.
127. O'Brien WA, Koyanag Y, Namazie A, Zhao JQ, Diagne A, Idler K *et al.* HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4 binding domain. *Nature* 1990; 342: 69-73.
128. Cann AJ, Churcher MJ, Boyd M, O'Brien W, Zhao JQ, Zack J *et al.* The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J Virol* 1992; 66(1): 305-309.
129. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly K, Cullen BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991; 253: 71-74.
130. York-Higgins D, Cheng-Mayer C, Baue D, Levy JA, Dina D. Human immunodeficiency virus type 1 cellular host range, replication and cytopathicity are linked to the envelope region of viral genome. *J Virol* 1990; 64: 4016-4020.
131. Liu ZQ, Wood C, Levy J, Cheng-Mayer C. The viral envelope gene is involved in macrophage tropism of a human immunodeficiency virus type 1 strain isolated from brain tissue. *J Virol* 1990; 64: 6148-6153.
132. Shioda T, Levy J, Cheng-Mayer. Macrophage and T cell line tropism can be determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 1991; 349: 167-169.
133. Westervelt P, Gendelman H, Ratner L. Identification of a determinant within the human immunodeficiency virus type 1 surface envelope protein critical for productive infection of primary monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3097-3101.
134. Takeuchi Y, Akutsu M, Murayama K, Shimizu N, Hoshino H. Host range mutant human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the env gene. *J Virol* 1991; 65: 1710-1718.
135. Sharpless NE, O'Brien WA, Verdin E, Kufra CV, Chen ISY, Dubois-Dalq M. Human immunodeficiency virus type 1 tropism for brain microglial cells is determined by a region of the env glycoprotein that also controls macrophage tropism. *J Virol* 1992; 66(4): 2588-2593.
136. Hattori TA, Kaito K, Takatsuki H, Katunuma N. Involvement of trypsin-related cellular protease(s) in HIV-1 infections. *FEBS Letters* 1989; 248: 48-52.
137. Kido H, Fukutomi A, Katunuma N. A novel membrane-bound serine esterase in human CD4 lymphocytes immunologically reactive with antibody inhibiting syncytia induced by HIV. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1990; 265: 21979-21985.
138. Clements GL, Price-Jones MJ, Stephens PE, Sutton C, Schultz TF, Clapham PR *et al.* The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contains proteolytic cleavage sites: A possible function in viral fusion? *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7: 3-16.
139. Murakami T, Hattori T, Takatsuki KA. Principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 interacts with proteinase-like molecule(s) at the surface of Molt4 clone 8 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; 1079: 279-284.
140. Avril LE, Di Martino-Ferrer M, Barin F, Gauthier F. Interaction between a membrane-associated serine proteinase of U-937 monocytes and peptides from the V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 envelope glycoprotein. *FEBS* 1993; 317(12): 167-172.
141. Callebaut C, Krust B, Jacotot E, Hovanessian A. T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells. *Science* 1993; 262: 2045-2050.
142. Autiero M, Abrescia P, Dettin M, Di Bello C, Guardiola J. Binding to CD4 of synthetic peptides patterned on the principal neutralizing domain of HIV-1 envelope protein. *Virology* 1991; 185: 820-828.
143. Batinic D, Robey FA. The V3 region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 binds sulfated polysaccharides and CD4-derived synthetic peptides. *J Biol Chem* 1992; 267: 6664-6671.
144. Camerini D, Seed B. A CD4 domain important for HIV mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* 1990; 60: 747-754.
145. Truneh A, Buck D, Cassat DR, Juszczak, R, Kassis S, Ryu SE *et al.* A region in domain 1 of CD4 distinct from the primary gp120 binding site is involved on HIV infection and virus mediated fusion. *J Biol Chem* 1991; 266: 5942-5948.
146. Langedijk JPM, Puijk WC, Hoorn WPN, Melen RH. Location of CD4 dimerization site explains critical role of CDR3-like in HIV-1 infection and T cell activation and implies a model for complex of coreceptor-MHC. *J Biol Chem* 1993; 268: 16875-16878.
147. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly K, Cullen BR. Identification of the envelope V3' loop as the mayor determinant of CD4 neutralization sensitivity. *Science* 1991; 257: 535-537.
148. De Rossi A, Pasta M, Mammano F, Panozzo M, Dettin M, Di Bello C *et al.* Synthetic peptides from the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) enhance HIV-1 infection through a CD-dependent mechanism. *Virology* 1991; 184: 187-196.
149. Nehete RN, Arlinghaus RB, Sastry KJ. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection and syncytium formation in human cells by V3 loop synthetic peptides from gp120. *J Virol* 1993; 67: 6841-6846.
150. Fantini J, Yahi N, Mabrouk K, van Rietschoten J, Rochat H, Sabatier JM. *CR Acad Sci Paris* 1993; 316: 1381-1387.
151. Yahi N, Fantini J, Mabrouk K, Tamalet K, de Micco P, van Rietschoten J *et al.* Multibranch V3 peptides inhibit HIV-1 infection in human lymphocytes and macrophages. *J Virol* 1994; 68(9): 5714-5720.
152. Benjouad A, Fenouillet E, Gluckman JC, Sabatier JM. Multi-branched peptide constructs (MBPC) of the V3 loop of envelope glycoprotein gp120 inhibit human immunodeficiency virus induced syncytium formation. *Antiviral Chem Chemother* 1994; 5: 195-196.
153. Benjouad A, Chapuis F, Fenouillet E, Gluckman JC. Multibranch peptide constructs derived from the V3 loop of envelope glycoprotein gp120 inhibit Human Immunodeficiency Virus type 1 infection through interaction with CD4. *Virology* 1995; 206: 457-464.
154. Lu S, Putney S, Robinson H. Human immunodeficiency virus type 1 entry to T cell: More rapid escape from an Anti V3 loop than from an antireceptor antibody. *J Virol* 1992; 66(4): 2547-2550.

155. Yahi N, Baghdiguian S, Moreau H, Fantini J. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency type 1 on human colon epithelial cells. *J Virol* 1992; 66: 4448-4454.
156. Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL, Lughlin M, Stefano K, Silberberg DH *et al.* Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 1991; 253: 320-323.
157. Bhat S, Spitalnik S, González Scarano F, Silberberg DH: Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7131-7134.
158. Yahi N, Fantini J, Baghdiguian S, Mabrouk K, Tamalet C, Rochat H *et al.* SPC3, a synthetic peptide derived from the V3 domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120, inhibits HIV-1 entry into CD4+ and CD4- cells by two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4867-4871.
159. Moore JP, Trkola A, Korber B, Boots LJ, Kessler JA, McCutchan FE *et al.* A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of a human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside Clade B. *J Virol* 1995; 69(1): 122-130.
160. VanCott TC, Bethke FR, Polonis VR, Gorny M, Zolla-Pazner S, Redfield RR *et al.* Dissociation rate of antibody gp120 binding interactions is predictive of V3 mediated neutralization of HIV-1. *J Immunol* 1994; 153(1): 449-459.
161. Spear GT, Takefman DM, Sullivan EK, Landay AL, Zolla-Pazner S. Complement activation by human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *J Virol* 1993; 67(1): 53-59.
162. Nakamura M, Sasaki H, Terada M, Ohno T. Complement-dependent virolysis of HIV-1 with monoclonal antibody NM-01. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9(7): 619-626.
163. Tilley SA, Honnen WJ, Racho ME, Chou TC, Pinter A. Synergistic neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibodies against the V3 loop and the CD4 binding site of gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(4): 461-467.
164. Montefiori DC, Stewart K, Aheam JM, Zhou J. Complement mediated binding of naturally glycosylated and glycosilation-modified HIV-1 to human CR2 (CD21). *J Virol* 1993; 67: 2699-2706.
165. Matsushita S, Maeda H, Kimachi K. Characterization of a mouse/human chimeric monoclonal antibody (C beta 1) to a principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(6): 1107-1115.
166. Duarte CA, Pérez L, Vázquez J, Dueñas M, Vilarubia OL, Navea L *et al.* Epitope mapping, V region DNA sequence, and neutralizing Fab fragments of two monoclonal antibodies against the HIV-1 V3 loop. *Immunotechnology* 1996; 2: 11-20.
167. Levi M, Sallberg M, Ruden U, Herlyn D, Maruyama H, Wigzell H *et al.* A complementarity determining region synthetic peptide acts as a miniantibody and neutralizes human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4374-4378.
168. Burton D, Barbas C, Persson M, Koenig S, Chanock R, Lerner R. A large array of human monoclonal antibodies to HIV-1 from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10134-10137.
169. Barbas CF, Collet TA, Roben P, Binley J, Amberg W, Hoekstra D *et al.* Molecular profile of the antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol* 1993; 230: 812-823.
170. Barbas CA, Hu D, Dunlop N, Sawyer L, Cababa D, Hendry M *et al.* *In vitro* evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3809-3813.
171. Vancott TC, Polonis VR, Loomis LD, Michael NL, Nara PL, Bix DL. Differential role of V3-specific antibodies in neutralization assays involving primary and laboratory-adapted isolates of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(12): 1379-1390.
172. D'Zouza MP, Milman G, Bradac JA, McPhee D, Hanson CV, Hendry RM *et al.* Neutralization of primary HIV-1 isolates by anti-envelope monoclonal antibodies. *AIDS* 1995; 9(8): 867-874.
173. Conley AJ, Gorny M, Kessler JA, Boots LJ, Osorio-Castro M, Koenig S *et al.* Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates by the broadly reactive antibody 447-52D. *J Virol* 1994; 68(1): 6994-7000.
174. Bou-Habib DC, Roderiquez G, Gravecz T, Berman P, Lusso P, Norcross MA. Cryptic Nature of the envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol* 1994; 68(9): 6006-6013.
175. Zolla-Pazner S, Sharpe S. A resting cell assay for improved detection of antibody mediated neutralization of HIV type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(12): 1449-1457.
176. Francis DP, Fast P, Harkonen S, McElrath ML, Belshe R, Berman P *et al.* X International Conference on AIDS, Yokohama, Japan, 1995, Abstract Book 1, Abs 314: 90.
177. Takeda A, Tuzon CU, Ennis FA. Antibody mediated infection by HIV via Fc receptors-mediated entry. *Science* 1988; 242: 580-583.
178. Robinson W, Montefiori DC, Mitchell WM. Antibody dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet* 1988; 1: 790-794.
179. Haubrich R, Takeda A, Koff W, Smith G, Ennis F. Studies of antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection mediated by Fc receptors using sera from recipients of recombinant gp160 experimental HIV-1 vaccine. *J Infect Dis* 1992; 165: 545-548.
180. Robinson WE, Gorny MK, Xu JY, Mitchell WM, Zolla-Pazner S. Two immunodominant domains of gp41 bind antibodies which enhance human immunodeficiency virus type 1 infection *in vitro*. *J Virol* 1991; 65: 44169-4176.
181. Eaton AM, Ugen KE, Weiner DB, Wildes T, Levy J. An anti gp41 human monoclonal antibody that enhances HIV-1 infection in the absence of complement. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(1): 13-18.
182. Jiang S, Lin K, Neurath AR. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by antisera to peptides from the envelope glycoproteins gp120/gp41. *J Exp Med* 1991; 174: 1557-1563.
183. Jiang S, Neurath AR. Potential risks of eliciting antibodies enhancing HIV-1 infection of monocytic cells by vaccination with V3 loops of un-matched HIV-1 isolates. *AIDS* 1992; 6: 331-342.
184. Takeda A, Ennis FA, Robinson JE, Ho DD, Debouck C. Characterization of enhancement of HIV-1 infection by human monoclonal antibodies to HIV-1. In: *Vaccines 91*, 1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 23-27.
185. Takeda A, Robinson JE, Ho DD, Debouck C, Haigwood NL, Ennis FA. Distinction of human immunodeficiency virus type 1 neutralization and infection enhancement by human monoclonal antibodies to glycoprotein 120. *J Clin Invest* 1992; 89: 1952-1957.
186. Emini E, Nara PO, Schleif WA, Lewis JA, Davide JP, Lee DR *et al.* Antibody mediated *in vitro* neutralization of human immunodeficiency virus type 1 abolishes infectivity for chimpanzees. *J Virol* 1990; 64(8): 3674-3678.
187. Emini E, Schleif WA, Numberg JH, Conley AJ, Eda Y, Tokiyoshi S *et al.* Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain specific monoclonal antibody. *Nature* 1992; 355: 728-730.
188. Safrin J, Fung M, Andrews CA, Braun DG, Sun W, Chang T *et al.* hu-PBL-SCID mice can be protected from HIV-1 infection by passive transfer of monoclonal antibody to the principal neutralizing determinant of envelope gp120. *AIDS* 1993; 7: 15-21.

189. Hinkula J, Bratt G, Gilljam G, Nordlund S, Broliden PA, Holmberg V *et al.* Immunological and virological interactions in patients receiving passive immunotherapy with HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies. In: Functionally Important HIV-1 B cell determinants mapped with monoclonal antibodies. Phd Thesis, Stockholm, 1993.
190. Gunthard HF, Gowland, Schupbach, Fung M, Boni J, Liou RS *et al.* A phase I/IIA clinical study with a chimeric mouse-human monoclonal antibody to V3 loop of human immunodeficiency virus Type 1 gp120. *J Infect Dis* 1994; 170: 1384-93.
191. Wahren B, Bratt G, Hinkula J *et al.* Monoclonal antibodies given as passive treatment to HIV infected individuals. In: Girard M, Valette L, eds. *Retroviruses of Human AIDS and related animal diseases. 5^e Colloque des Cent Gardes.* Paris, 1990, Pasteur Merieux, Abstracts Book: 263-267.
192. Morell A, Terry WD, Waldman TA. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest* 1970; 49: 673-680.
193. Metlas R, Skerl V, Pongor S, Colombatti A, Veljkovic V. Reactivity of AIDS patient sera with a peptide derived from HIV type 1 NYS glycoprotein 120 V3 loop consensus sequence of collagens. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(11): 1425-1426.
194. Grant MD, Weaver MS, Tsoukas C, Hoffmann GW. Distribution of antibodies against denatured collagen in AIDS patients suggest a link between autoimmunity and the immunopathogenesis of AIDS. *J Immunol* 1990; 144: 1241-1250.
195. Trujillo JR, McLane MF, Lee TH, Essex M. Molecular mimicry between the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop and human brain proteins. *J Virol* 1993; 67(12): 7711-7715.
196. Douvas A, Takehana Y. Cross-reactivity between autoimmune anti U1 snRNP antibodies and neutralizing epitopes of HIV-1 gp120/1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(3): 253-262.
197. Rakowicz-Szulczynska, Kaczmarek W, Raso V, Steimer K, Durda P. Internalization of anti-gp120 monoclonal antibody and human antibodies by HIV-1 infected lymphocytes. Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 1993; 6(4): 209-219.
198. Berberian L, Goodglick L, Kipps TJ, Braun J. Immunoglobulin VH3 gene products: Natural ligands for HIV gp120. *Science* 1993; 261: 1588-1591.
199. Berberian L, Valles-Ayoub, Sun N, Martínez-Maza, Braun J. A VH clonal deficit in HIV-positive individuals reflects a B-cell maturational arrest. *Blood* 1991; 78: 175.
200. Kohler H, Muller S, Nara P. Deceptive imprinting in the immune response against HIV-1. *Immunol Today* 1994; 15(10): 475-478.
201. Metlas R, Veljkovic V. Does the HIV-1 manipulate immune network via gp120 immunoglobulin-like domain involving V3 loop? *Vaccine* 1995; 13(4): 355-359.
202. Goodglick L, Zevit N, Neshat M, Braun J. Mapping the Ig Superantigen-binding site of HIV-1 gp120. *J Immunol* 1995; 155(11): 5151-5159.
203. Takahashi H, Cohen J, Hosmalin A, Cease KB, Houghton R, Cornette JL *et al.* An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted immune cytotoxic T lymphocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988; 85: 3105.
204. Lasarte J, Sarobe P, Gullón A, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Induction of cytotoxic lymphocytes in mice against the PND of HIV-1 by immunization with an engineered T-cytotoxic-T-helper synthetic peptide construct. *Cell Immunol* 1992; 141: 211-218.
205. Marinon F, Grasmassé H, Boutillon C, Chirat F, Duprez B, Guillet JG, Gomard E, Tartar A, Levy JP. Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant immune response of Balb/c mice to HIV-1 envelope glycoprotein. *J Immunol* 1993; 149(10): 3416-3422.
206. Clerici M, Lucey DR, Zajac RA, Boswell RN, Gebel HM, Takahashi H, Berzofsky JA, and Shearer GM. Detection of CTL specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J Immunol* 1991; 146: 2214-2219.
207. Achour A, Picard O, M'bika JP, Willer A, Snaat R, Bizini B *et al.* Envelope protein and P18IIIB peptide recognized by cytotoxic T-lymphocytes from human immunized with AIDS virus envelope. *Vaccine* 1993; 11: 699-701.
208. Achour A, Lemhammedi S, Picard O, M'bika JP, Zagury JF, Moukrim Z *et al.* Cytotoxic T lymphocytes specific for HIV-1 gp160 antigen and synthetic peptide in an HLA-A11 immunized individual. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(1): 19-25.
209. Takahashi H, Houghton R, Putney SD, Margulies DH, Moss B, Germain RN *et al.* Structural requirements for class I MHC molecule-mediated antigen presentation and cytotoxic T-cell recognition of an immunodominant of the human immunodeficiency virus envelope protein. *J Exp Med* 1989; 170: 2023-2035.
210. Takahashi H, Germain RN, Moss B, Berzofsky JA. An immunodominant class I-restricted cytotoxic Y-lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II restricted help for itself. *J Exp Med* 1990; 17: 571-576.
211. Safrit JY, Lee AY, Andrews CA, Koup RA. A region of the third variable loop of HIV-1 is recognized by HLAB7 restricted CTL from two acute seroconvertors. *J Immunol* 1994; 153: 3822-3830.
212. Takahashi H, Merli S, Putney SC, Houghton R, Moss B, Germain RN *et al.* A single amino acid interchange yield reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp160. *Science* 1989; 246: 118-121.
213. Philips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogulnesi AO *et al.* human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991; 354: 453-459.
214. Takahashi H, Nakagawa Y, Pendleton CD, Houghton RA, Yokomuro K, Germain RN *et al.* Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing and HIV-1 envelope determinant. *Science* 1992; 255: 333-336.
215. Harris SJ, Gearing AJH, Layton GT, Adams SE, Kingsman AJ. Enhanced proliferative cellular response to HIV-1 V3 peptide and gp120 following immunization with V3-Ty virus like particles. *Immunology* 1993; 77(3): 315-321.
216. Moore RL, Fox B. Immunization of mice with human immunodeficiency virus glycoprotein gp160 peptide 315-329 induces both class I and class II restricted T cells: Not all cells can respond to whole molecule stimulation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9(1): 51-59.
217. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Berstein DC, Mann DL *et al.* Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from a symptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature* 1989; 339: 383-385.
218. Clerici M, Tacket CO, Via CS, Lucey DR, Muluk SC, Zajac RA *et al.* Immunization with subunit human immunodeficiency virus vaccine generates stronger T helper cell immunity than natural infection. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1345-1349.
219. Gorse J, Belshe RB, Newman FK, Frey SE, the NIAID AIDS vaccine clinical trials network. Lymphocyte proliferative responses following immunization with human immunodeficiency virus recombinant gp160. *Vaccine* 1992; 10(6): 1992.
220. Neurath R, Jiang S, Strick N, Kolbe H, Kiény M, Muchmore E *et al.* Antibody responses of chimpanzees immunized with synthetic peptides corresponding to full length V3 hyper-variable loops of HIV-1 envelope glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7(10): 813-823.
221. Tolman RL, Bednarek MA, Johnson BA, Leanza WJ, Marburg S, Underwood DJ *et al.* Cyclic V3 Loop related HIV-1 conjugate vaccines. Synthesis, conformation and immunological properties. *Int J Peptide Protein Res* 1993; 41: 455-466.
222. Javaherian K, Langlois AJ, La Rosa GJ, Profy AT, Bolognesi DP, Herlihy

- WC *et al.* Broadly Neutralizing Antibodies Elicited by the Hypervariable Neutralizing Determinant of HIV-1. *Science* 1990; 250: 1590.
223. Putney SD, La Rosa GJ, Profy AT, Silver S, Scott CF, Javaherian K *et al.* HIV-1 principal neutralization determinant elicits broadly neutralizing antibodies. In: *Vaccines 91*, 1991, Cold Spring Harbor Laboratory. Edited by Brown F, Chanock and RM and Lerner RA.
224. Palker TJ, Matthews TJ, Langlois A, Tanner ME, Martin ME, Scarce RM *et al.* Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. *J Immunol* 1989; 142(10): 612-3619.
225. Hart MK, Palker TJ, Matthews TJ, Langlois AJ, Lerche NW, Martin ME *et al.* Synthetic peptides containing T and B cell epitopes from human immunodeficiency virus envelope gp120 induce anti-HIV proliferative responses and high titers of neutralizing antibodies in rhesus monkeys. *J Immunol* 1990; 146(8): 2677-2685.
226. Nardelli B, Lu YA, Shiou D, Del-pierre-Defoort C, Profy A, Tam JP. A chemically defined synthetic vaccine model for HIV-1. *J Immunol* 1992; 148: 914-920.
227. Profy A, Salinas P, Khiroya R, Sax S, Hanham C, Boyd J. Immunogenicity of synthetic peptides corresponding to the V3 region of gp120. *IVth Int Conf on AIDS*, Berlin, 1993. PO-A29-0688, Abstract Book 1: 249.
228. Cryz SJ, Goldstein H, Petteo-llo-Mantovani M, Kim A, Furer E, Que JU, Hasler T *et al.* Human Immunodeficiency virus -1 Principal neutralizing domain peptide-toxin A conjugate vaccine. *Vaccine* 1995; 13(1): 67-71.
229. Mitsuda S, Nakagawa T, Osada T, Shimamoto T, Nakazato H, Ikai A. A receptor mediated delivery of an HIV-1 derived peptide vaccine. *Biochem and Biophysical Res Communications* 1993; 194(3): 1155-1160.
230. Defoort JP, Nardelli B, Huang W, Ho D, Tam JP. Macromolecular assemblage in the design of a synthetic AIDS vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3879-3883.
231. Montero M, Menéndez A, Domínguez MC, Navea L, Vilarubia OL, Quintana D *et al.* Broadly reactive antibodies against a gp120 V3-loop Multi-Epitope Polypeptide neutralize different isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Sent to *Vaccine* for publication.
232. Wagner R, Fliessbach H, Modrow S, vonBrunn A, Wolf H, Boltz T *et al.* Expression of HIV-1 autologous p55v and p55/gp120-V3 core particles: A new approach in HIV vaccine development. *Vaccines 91*, 1991: 109-113, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
233. Luo LZ, Li Y, Cannon PM, Kim SY, Kang CY. Chimeric gag-V3 virus-like particles of human immunodeficiency virus Induce virus neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 21.
234. Fung MS, Sun CRY, Gordon W, Chang NT, Chang TW, Sun NC. Monoclonal anti-idiotypic antibody mimicking the principal neutralizing site in HIV-1 gp120 induces HIV-1 neutralizing antibodies in rabbits. *J Immunol* 1990; 145(7): 2199-2206. Boudet F, Theze J, Zouali M. Anti-idiotypic antibodies to the third variable domain of gp120 induce an anti HIV-1 antibody response in mice. *Virology* 1994; 200: 176-188.
235. Kang CY, Nara P, Chamat S, Caralli V, Chen A, Nguyen ML *et al.* Anti-idiotypic antibody elicits broadly neutralizing anti-gp120 antibodies in monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2546-2550.
236. Fontenot JD, Gatewood JM, Mariappan S, Pau CP, Parekh B, George R *et al.* human immunodeficiency virus (HIV) antigens: Structure and serology of multivalent human mucin MUC1-HIV V3 chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 315-319.
237. Gorse G, Keefer MC, Belshe RB, Matthews TJ, Forrest BD, Hsieh RH, Koff WC, Hanson CV, Dolin R, Weinhold KJ, Frey SE, Kettler N, Fast PE. A dose ranging study of a prototype synthetic HIV (MN) branched peptide vaccine. *J Infect Dis* 1996; 173(2): 330-339.
238. Salmon-Ceron D, Excler JL, Sicard D, Blanche P, Finkielstzjen, Gluckman JC *et al.* Safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 glycoprotein 160 boosted by a V3 synthetic peptide in HIV-negative volunteers. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(12): 1479-1486.