

Dürfen wir noch auf eine HIV-Impfung hoffen?

Stand der Impfstoffentwicklung

Prof. Dr. Ralf Wagner

Molekulare Mikrobiologie (Virologie), Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Universität Regensburg, Regensburg

Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg,
Regensburg

Koautor: Dr. Benedikt Asbach, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Universität Regensburg, Regensburg

Title: Is there still hope for an HIV vaccine? Current status of vaccine development

Keywords (3-6): HIV vaccine, efficacy trials, correlates of protection, envelope protein,
broadly neutralizing antibodies

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Ralf Wagner

Molekulare Mikrobiologie (Virologie)

Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Universität Regensburg

Franz-Josef-Strauß-Allee 11

93053 Regensburg

E-Mail: ralf.wagner@ur.de

Telefon: +49 941 944 6452

Impfungen gehören zu den bedeutendsten Gesundheitsmaßnahmen in der Historie der moderneren Medizin. Die WHO schätzt, dass Impfungen jedes Jahr mehr als 2,5 Millionen Todesfälle alleine bei Kindern verhindern [1]. Dennoch sterben jedes Jahr mehrere Millionen Menschen in Folge von Infektionserkrankungen, allen voran an den "Großen Drei": Tuberkulose, Malaria und AIDS. Dementsprechend wird zwar seit langem und mit großem Aufwand, bislang aber noch überschaubarem Erfolg versucht, effektive Impfstoffe gegen diese Krankheiten zu entwickeln, so dass immer wieder die Frage gestellt wird, ob überhaupt noch Hoffnung besteht, jemals entsprechende Impfstoffe zur Verfügung zu haben.

Impfstoff-Entwicklung

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der erstmaligen Einführung von Impfstoffen gegen bestimmte Erreger (siehe Abb. 1), so ist der Fortschritt bei der Impfstoffentwicklung ungebrochen. Seit der Jahrtausendwende wurden immerhin fünf Impfstoffe gegen neue Ziele zugelassen, darunter zwei, die nicht auf klassischen Herstellungs-Arten, nämlich der Verwendung abgetöteter bzw. attenuierter, d. h. abgeschwächter Erreger beruhen, sondern mit modernen Verfahren biotechnologisch produziert werden. So handelt es sich beim Impfstoff gegen humane Papillomviren (HPV), der vor Gebärmutterhalskrebs schützt, um polyvalente Virus-artige Partikel (*virus-like particles* = *VLPs*), die sich aus dem rekombinant hergestellten Kapsid-Protein des Virus zusammensetzen. Beim Malaria-Impfstoff wurde ein Bestandteil des Erregers *Plasmodium falciparum* gentechnisch an das HBsAg-Protein gekoppelt, das den Impfstoff gegen Hepatitis B darstellt und ebenfalls VLPs bildet. Der Malaria-Impfstoff hat allerdings nur eine moderate Wirksamkeit, weshalb derzeit größere Studien vorgenommen werden, um herauszufinden, wie der Impfstoff effizient eingesetzt werden kann. Den genannten Impfstoffen werden darüber hinaus Adjuvantien als Wirkverstärker der Immunantwort zugesetzt, von denen in den letzten Jahren ebenfalls eine Reihe potenterer Substanzen entwickelt und erfolgreich am Menschen getestet wurden.

Die genannten Beispiele verdeutlichen also die erfolgreiche und kontinuierliche Entwicklung, sowohl was die Abdeckung neuer Erreger, als auch die zugrundeliegenden Technologie-plattformen angeht.

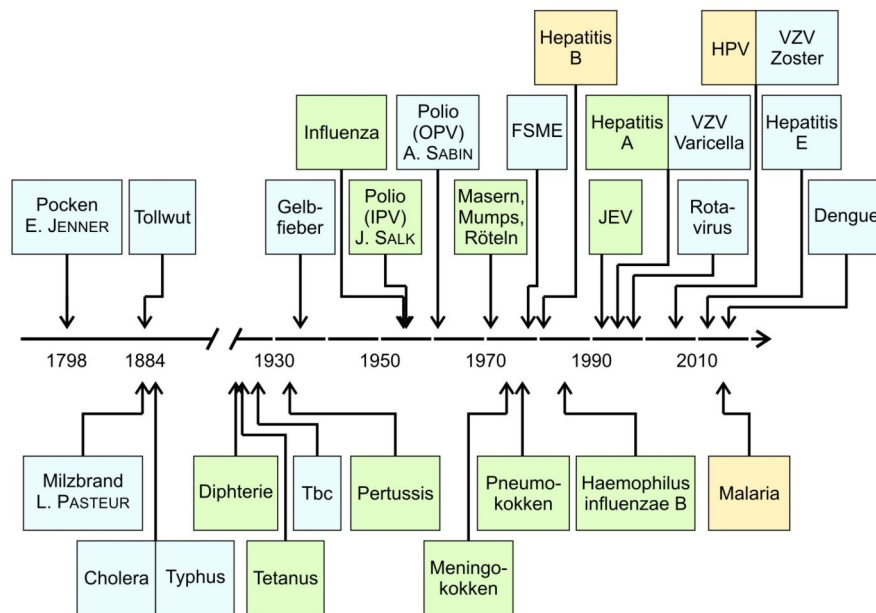


Abb. 1

Wirksamkeitsstudien von HIV-Impfstoff-Kandidaten

Wie ist nun der Stand bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen das humane Immundefizienzvirus (HIV)? Bislang wurden vier verschiedene Konzepte am Menschen in sechs Phase-III-Studien erprobt, die eine Aussage über die Wirksamkeit eines solchen Impfstoffes zulassen. Nur bei einer dieser Studien, dem sog. "Thai-Trial", wurde erstmals ein moderater, statistisch signifikanter Schutzeffekt beobachtet [2]. Die Teilnehmer erhielten nacheinander zwei verschiedene Impfstoffe (heterologes Prime (A) / Boost (B) Schema): (A) ein harmloses Vogelpockenvirus, das die genetische Information für mehrere HIV-Antigene kodiert und diese gleich einem Trojanischen Pferd im Zuge der intramuskulären Verabreichung in Muskelzellen einschleust und dort sichtbar für das Immunsystem zur Expression bringt, sowie (B) ein Fragment des Oberflächenproteins von HIV – das Hüllprotein (*envelope protein*), kurz Env genannt – das gentechnisch in Zellkultur hergestellt und dann zusammen mit einem Adjuvans verabreicht wurde. Von den etwas mehr als 7000 Geimpften infizierten sich im Laufe des 3,5-jährigen Beobachtungszeitraums 51 Personen mit HIV, während in der parallel beobachteten, ähnlich großen Placebo-Gruppe 74 Infektionen auftraten. Hieraus ergibt sich eine Schutzwirkung von 31 %, die das Niveau der statistischen Signifikanz erreichte. Dieses Ergebnis gilt als Silberstreifen am Horizont der HIV-Impfstoffentwicklung, das mit Blick auf die Chancen der erfolgreichen Entwicklung eines breit einsetzbaren HIV Impfstoffes als erstes belastbares *Proof of Principle* wahrgenommen wird.

Finanzierung der HIV-Impfstoffentwicklung

Die Ergebnisse des Thai-Trials weckten neue Hoffnungen bei Wissenschaftlern und auch den Geldgebern der öffentlichen Hand, die der HIV-Impfstoffentwicklung neuen Schwung gebracht haben. Insbesondere auf Ebene der Europäischen Union (7. Rahmenprogramm und Horizont 2020) und der *National Institutes of Health* (NIH, USA) wurden substantielle Mittel für die HIV Impfstoffentwicklung bereitgestellt, aus denen einige deutsche Arbeitsgruppen inkl. Teile der eigenen Arbeitsgruppe finanziert werden. Trotz dieser erfreulichen Initiativen ist eine erfolgreiche Entwicklung, Testung und spätere Einführung von Impfstoffen gegen HIV, aber auch gegen andere, vernachlässigte Infektionserkrankungen, ohne die immensen finanziellen und strukturellen Beiträge privater Stiftungen, allen voran der Bill und Melinda Gates Stiftung, sowie der Beiträge aus der Pharma- und Biotechindustrie undenkbar. Die eng verzahnte Interaktion von öffentlicher Hand, Stiftungen und Industrie auf internationaler Ebene über sogenannte *Private-Public-Partnerships* (PPP) gilt heute als unverzichtbare Voraussetzung für die Entwicklung, präklinische und klinische Testung sowie spätere Implementierung von Impfstoffen insbesondere auch in den armen Ländern, die in besonderer Weise von HIV und anderen Infektionserkrankungen betroffen sind.

Lektionen aus dem Thai-Trial

Ein zentrales Motiv bei der Entwicklung von Impfstoffen ist die Suche nach immunologischen Korrelaten einer vor Infektion schützenden Immunantwort. Da es nun im Thai-Trial Probanden gab, die zumindest vorübergehend aufgrund der Immunreaktion gegen den Impfstoff vor einer HIV-Infektion geschützt waren, bot sich die Möglichkeit im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien nach solchen Korrelaten zu suchen. Begünstigend wirkte sich dabei aus, dass in zwei weiteren Studien (VAX003 und VAX004), bei denen die Protein-Komponente separat ohne das Vogelpockenvirus verimpft wurde, keinerlei Schutz vor HIV Infektion nachgewiesen werden konnte [3,4]. Bei der tiefgreifenden immunologischen Analyse der sorgfältig ausgewählten Vergleichskollektive zeigte sich, dass für den Schutz ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren im Rahmen einer polyfunktionellen Immunreaktion notwendig ist [5]. Insbesondere Antikörper, die gegen die Schleife Nr. 2 (*V2-loop*) des Oberflächenproteins gerichtet sind, spielen eine wichtige Rolle, v. a. wenn sie vom Subtyp IgG3 sind. Interessanterweise waren diese Antikörper nicht direkt Virus-neutralisierend, sondern wirkten über andere Effektorfunktionen, wie z. B. die Zerstörung produktiv infizierter Zellen durch Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Cytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) [6]. Des Weiteren sind polyfunktionelle T-Helferzellen relevant, die in der Lage sind, mehrere Cytokine zu

sezernieren. Interessanterweise ergab sich mit IgA-Antikörpern im Serum (IgA wirkt normalerweise in der Mucosa) auch ein negatives Korrelat, das die Wirkung der anti-V2-Antikörper aufhob. Diese Ergebnisse werden durch Versuche komplementiert, bei denen rekombinant hergestellte breit-neutralisierende Antikörper (s.u.) passiv verabreicht wurden. Bei Makaken konnte dadurch eine Infektion mit dem Affen-Immundefizienzvirus verhindert werden [7]. Bei HIV-Patienten führte die Verabreichung zu einer transienten Unterdrückung der Virus-Vermehrung, auch wenn die antivirale Kombinationstherapie vorübergehend unterbrochen wurde [8].

Insgesamt bestätigen diese Befunde, dass Antikörper-Antworten allgemein eine zentrale Bedeutung zukommt, und damit auch dem Env-Protein von HIV, weil es das einzige virale Protein auf der Oberfläche von infizierten Zellen und Viruspartikeln und somit als einziges für Antikörper zugänglich ist.

Wechselwirkung zwischen dem HIV-Hüllprotein und Antikörpern

Eine Reihe technologischer Fortschritte hat in den letzten fünf bis zehn Jahren zu bedeutenden neuen Erkenntnissen zur Struktur und Funktion des viralen Hüllproteins, der gegen das Hüllprotein gerichteten Antikörper, sowie der Co-Evolution des Hüllproteins und der Antikörperantwort geführt.

Bei dem HIV-Hüllprotein Env handelt es sich um ein Glykoprotein, das eine relativ komplexe Struktur besitzt (Abb. 2). Als Trimer besteht es aus drei Untereinheiten, die jeweils von einer zellulären Protease in zwei Teile gespalten werden: den extrazellulären Anteil, der als gp120 bezeichnet wird (Glykoprotein mit einer Größe von 120 kDa), sowie den in der Virusmembran verankerten gp41-Anteil. gp120 ist nur schwach mit gp41 assoziiert und außerdem kann der Trimer-Komplex große Konformationsänderungen machen, wobei man vereinfachend von (i) einer geschlossenen, nativen Konformation und in Abgrenzung dagegen, (ii) einer offenen Konformation spricht. Dies hat jahrzehntelang die Aufklärung der molekularen Struktur verhindert. Mit der Herstellung gentechnisch stabilisierter Trimer-Varianten (sog. SOSIP-Proteine), die eine annähernd native Konformation aufweisen, gelang es 2013 eine erste Struktur des Trimers mittels Röntgenkristallanalyse zu ermitteln, die seitdem immer weiter verfeinert wurde (Abb. 2b) [9,10]. So ein molekulares Strukturmodell ist die Voraussetzung, um das Wechselspiel mit den Antikörpern, insbesondere im Hinblick auf die exakte dreidimensionale Struktur der zugehörigen konformationellen Epitope genau zu verstehen. Diese Informationen bilden die Grundlage für ein gezieltes Immunogen-Design (s.u.). Darüber hinaus trägt die Kenntnis der 3-D-Struktur zu einem besseren Verständnis vieler anderer

Aspekte rund um die Funktion und Wandlungsfähigkeit dieses für das Virus und die Pathogenese der HIV-Infektion kritischen Proteins bei.

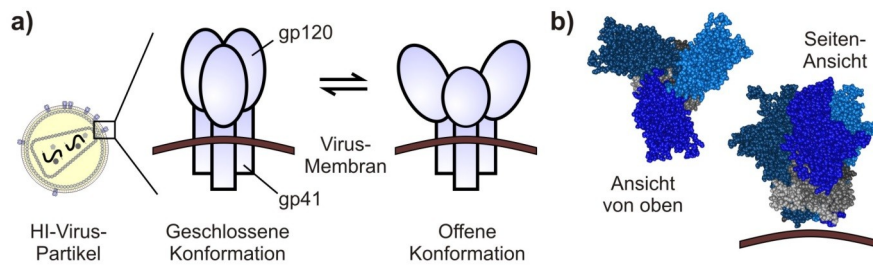


Abb. 2

Parallel dazu ist es gelungen, etliche sog. breit-neutralisierende Antikörper (bnAbs) zu identifizieren [11]. Unter "breiter Neutralisierung" durch einen Antikörper oder ein Antiserum versteht man die Fähigkeit, eine Vielzahl von HIV-Varianten aus den verschiedenen phylogenetischen HI-Virusklassen A-I in Zellkultur durch Bindung an das Hüllprotein direkt an der Infektion von permissiven Zellen in Kultur zu hindern. Derart breit-neutralisierende Antikörper entwickeln sich im Laufe der Jahre in vielen HIV-infizierten Patienten, ohne dass diese jedoch davon profitieren können. Ausgehend von naiven B-Zellen, die einen sog. Keimbahn-B-Zell-Rezeptor, also einen an die Zelloberfläche gebundenen Antikörper tragen, der auf eine Kombination aus Gensegmenten zurückgeht, wie man sie im Genom aller Körperzellen findet, entstehen durch den Prozess der Stimulation durch das Hüllprotein und anschließende Affinitätsreifung im Laufe der Zeit individuelle Antikörper, die infolge von erworbenen und immunologisch selektierten Mutationen mit höherer Affinität an eine bestimmte Zielstruktur binden. Da sich jedoch auch HIV im Patienten kontinuierlich verändert, hinken diese Antikörper in ihrer Wirksamkeit im betroffenen Patienten dem Virus leider hinterher und können es daher nicht effizient bekämpfen. Die o.g. Versuche zur passiven Verabreichung solcher bnAbs lassen aber vermuten, dass sie schützen könnten, wenn es gelänge, ihre Bildung im Rahmen einer Impfung hervorzurufen, bevor es zur Infektion mit HIV kommt.

Die Zusammenführung dieser komplementären Ergebnisse hat gezeigt, dass bnAbs sich in verschiedene Klassen einteilen lassen, die grob fünf "verwundbare Stellen" auf der Oberfläche des Env-Proteins angreifen.

Neue Impfstoff-Konzepte

Induktion breit-neutralisierender Antikörper durch Trimer-stabilisierte HIV Varianten und Fokussierung der Immunantwort

Wie werden diese neuen Erkenntnisse nun in neue Strategien für Impfstoffe übersetzt? Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung der künstlich stabilisierten SOSIP-Env-Proteine als Immunogen (Abb. 3a) Antikörper in präklinischen Tiermodellen hervorruft, die erstmals schwieriger zu neutralisierende HIV-Isolate ("Rang 2") inhibieren konnten, allerdings nur, wenn das gewählte Antigen zum jeweils getesteten Isolat passt (autologe Neutralisation) [12]. Ergänzend dazu wird versucht, Env-Varianten rational zu designen, die mit höherer Affinität an die bekannten bnAbs und schlechter an nicht-neutralisierende Antikörper binden, also potentiell nur die verwundbaren Stellen optimal dem Immunsystem präsentieren (Abb. 3b) [13].

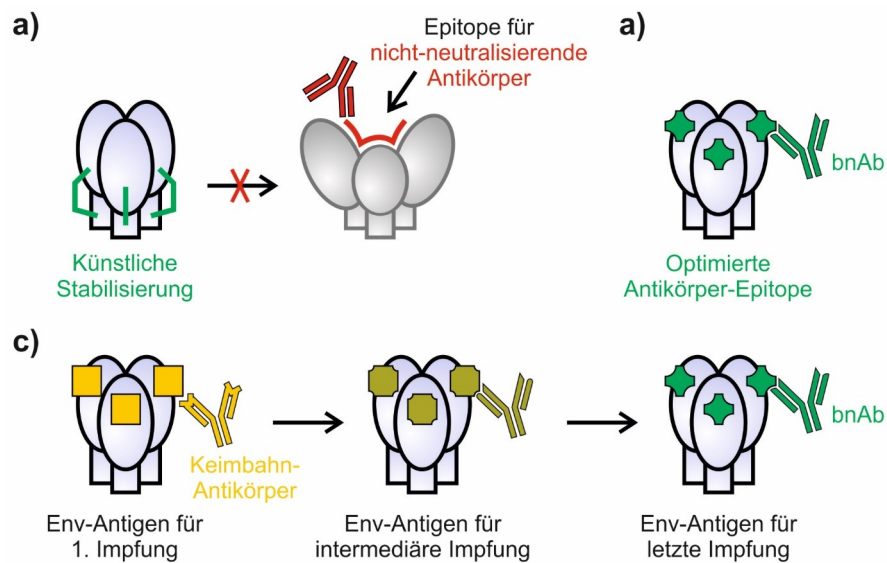


Abb. 3

Breit neutralisierende Antikörper durch Immunisierung mit einer sequentiellen Abfolge von Immunogenen

Ein sehr interessanter Ansatz ist darüber hinaus die Idee, die zeitliche Entwicklung der Antikörper gezielt zu steuern [14]. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass diejenigen Env-Proteine, die gut an die bnAbs binden, schlecht bzw. gar nicht an deren vermutete Keimbahn-Varianten binden. Also werden Antigene entwickelt, die gut an ebendiese Keimbahn-B-Zell-Rezeptoren binden und den Affinitätsreifungsprozess initiieren. Die weitere Entwicklung der Antikörper soll dann über Env-Varianten, die zunehmend dem bnAb-bindenden Env-Protein

ähneln bzw. dem Immunsystem entsprechende Antikörper-Epitope präsentieren, zum gewünschten bnAb hingeleitet werden (*guiding immunogens*). Im Verlauf des Impfschemas müssten diese verschiedenen Proteine sequentiell im richtigen zeitlichen Abstand verabreicht werden, was durchaus denkbar ist, wenn man berücksichtigt, dass auch bei vielen klassischen Impfstoffen (z.B. Hepatitis B, FSME) mehrere Impfungen nötig sind, um eine ausreichend starke und schützende Immunantwort hervorzurufen, wenn auch hier immer das gleiche Immunogen zum Einsatz kommt. In verschiedenen Tiermodellen konnte bereits bestätigt werden, dass die Immunogene, die auf die Keimbahn-Antikörper abzielen, die entsprechenden B-Zell-Vorläufer aktivieren können und auch eine Weiterentwicklung in Richtung der bnAbs möglich ist [15].

Passive Gabe von breit-neutralisierenden Antikörpern

Da jedoch aus heutiger Sicht fraglich ist, ob unser Immunsystem selbst in der Lage ist, ausreichende Konzentrationen derartiger breit-neutralisierender Antikörper zu produzieren, werden heute mit gentechnischen Verfahren monoklonale Antikörper hergestellt, die zwei oder drei verwundbare Stellen auf dem Virus-Hüllprotein gleichzeitig adressieren und nach passiver Gabe über Monate hinaus in den Probanden stabil sind. In therapeutischen Konstellationen konnte durch die passive Verabreichung von bnAbs die Viruslast bereits um einen Faktor 10 – 30 gesenkt werden. Gleichzeitig wird daran gearbeitet, die genetische Information für breit-neutralisierende Antikörper in virale Vektoren als Träger zu integrieren. Verabreicht man diese Vektoren beispielsweise intravenös oder intramuskulär, wird das Antikörper-Gen in Leber- oder Muskelzellen transferiert, die daraufhin den Antikörper als körpereigenes Protein produzieren.

Ausblick

Einige der oben genannten neuen Impfstoff-Konzepte werden bereits in ersten Phase I Sicherheitsstudien am Menschen getestet. Aufgrund der hohen regulatorischen Anforderungen für die Herstellung der Impfstoff-Kandidaten und der enormen logistischen Herausforderungen, welche die Organisation einer Phase III-Wirksamkeitsstudie mit sich bringen, wird es jedoch noch mehrere Jahre dauern, bis sich herausstellt, ob sich die vielversprechenden Ergebnisse aus den präklinischen Modellen in einen erfolgreichen HIV-Impfstoff für den Menschen übersetzen lassen. Parallel werden jedoch auch weitere Phase III-Studien durchgeführt, die naturgemäß ältere Konzepte testen. Aktuell läuft beispielsweise eine Studie, welche die Ergebnisse des Thai-Trials bestätigen soll. Bei dieser Studie (HVTN702), die derzeit in Südafrika läuft, wird das gleiche Impfschema getestet (Prime mit Vogelpockenvirus und Boost mit rekombinantem

Protein), wobei allerdings die Antigene auf HI-Viren abgestimmt wurden, die in Südafrika vorkommen. Es wird spannend zu erfahren, ob sich der Erfolg des Thai-Trials wiederholen lässt und vielleicht sogar eine höhere Wirksamkeit erzielt werden kann. Aber selbst wenn nicht, stehen neuartige, erfolgversprechende Konzepte also bereits bereit, so dass berechtigte Hoffnung besteht, mittelfristig auch HIV in die Liste der impfpräventablen Erkrankungen aufzunehmen.

Fazit für die Praxis

1. Im Thai-Trial von 2009 wurde erstmals ein moderater Schutz vor HIV durch aktive Impfungen erreicht.
2. Ausführliche Analysen dieser Studie gaben Hinweise auf die zugrundeliegenden Korrelate des Schutzes, wobei insbesondere bestimmte Antikörper-Subspezies gegen das HI-virale Oberflächenprotein Env, die mit definierten Effektorfunktionen einhergehen, eine maßgebliche Rolle spielen. In ausgedehnten Wirksamkeitsstudien wird nun versucht, diese Antikörper-Antworten durch Verwendung modernerer Env-Immunogene, Adjuvantien und verbesserter viraler Vektoren in einem größeren Anteil der geimpften Personen zu induzieren und über einen längeren Zeitraum zu stabilisieren.
3. Fortschritte bei der Charakterisierung neutralisierender Antikörper, die Aufklärung der Struktur des Env-Proteins sowie ein detailliertes Verständnis der Antikörper-Hüllprotein-Koevolution ermöglichen die rationale Entwicklung neuer Antigene und Impfstrategien als vielversprechende Impfstoff-Kandidaten.
4. Für den Fall, dass mit den genannten aktiven Immunisierungsstrategien die Induktion einer vor HIV-Infektion schützenden Immunantwort auf absehbare Zeit nicht möglich sein sollte, wird an Vakzinierungsstrategien gearbeitet, bei denen breit-neutralisierende Antikörper mit langer Plasma-Halbwertszeit passiv verabreicht oder nach Einschleusen über virale Vektoren, von Leber- oder Muskelzellen produziert werden.
5. Die passive Gabe von gentechnisch hergestellten breit-neutralisierenden Antikörpern und Derivaten daraus kann langfristig auch Implikationen auf die Behandlung von HIV-Infizierten haben.

Literatur

- ¹ WHO, UNICEF, World Bank. State of the world's vaccines and immunization. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2009
- ² Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premsri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009; 361: 2209–2220
- ³ Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, Hu D, Tappero JW, Choopanya K. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* 2006; 194: 1661–1671
- ⁴ Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; 191: 654–665
- ⁵ Tomaras GD, Plotkin SA. Complex immune correlates of protection in HIV-1 vaccine efficacy trials. *Immunol Rev* 2017; 275: 245–261
- ⁶ Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, Evans DT, Montefiori DC, Karnasuta C, Sutthent R, Liao H-X, DeVico AL, Lewis GK, Williams C, Pinter A, Fong Y, Janes H, DeCamp A, Huang Y, Rao M, Billings E, Karasavvas N, Robb ML, Ngauy V, de Souza MS, Paris R, Ferrari G, Bailer RT, Soderberg KA, Andrews C, Berman PW, Frahm N, De Rosa SC, Alpert MD, Yates NL, Shen X, Koup RA, Pitisuttithum P, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Rerks-Ngarm S, Michael NL, Kim JH. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* 2012; 366: 1275–1286
- ⁷ Moldt B, Rakasz EG, Schultz N, Chan-Hui P-Y, Swiderek K, Weisgrau KL, Piaskowski SM, Bergman Z, Watkins DI, Poignard P, Burton DR. Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 18921–18925
- ⁸ Caskey M, Klein F, Lorenzi JCC, Seaman MS, West AP, Buckley N, Kremer G, Nogueira L, Braunschweig M, Scheid JF, Horwitz JA, Shimeliovich I, Ben-Avraham S, Witmer-Pack M, Platten M, Lehmann C, Burke LA, Hawthorne T, Gorelick RJ, Walker BD, Keler T, Gulick RM, Fätkenheuer G, Schlesinger SJ, Nussenzweig MC. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* 2015; 522: 487–491
- ⁹ Julien J-P, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, Deller MC, Klasse P-J, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Ward AB, Wilson IA. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 2013; 342: 1477–1483
- ¹⁰ Stewart-Jones GBE, Soto C, Lemmin T, Chuang G-Y, Druz A, Kong R, Thomas PV, Wagh K, Zhou T, Behrens A-J, Bylund T, Choi CW, Davison JR, Georgiev IS, Joyce MG, Kwon YD, Pancera M, Taft J, Yang Y, Zhang B, Shivatare SS, Shivatare VS, Lee C-CD, Wu C-Y, Bewley CA, Burton DR, Koff WC, Connors M, Crispin M, Baxa U, Korber BT,

Wong C-H, Mascola JR, Kwong PD. Trimeric HIV-1-Env Structures Define Glycan Shields from Clades A, B, and G. *Cell* 2016; 165: 813–826

- ¹¹ Burton DR, Hangartner L. Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annu Rev Immunol* 2016; 34: 635–659
- ¹² Sanders RW, van Gils MJ, Derking R, Sok D, Ketas TJ, Burger JA, Ozorowski G, Cupo A, Simonich C, Goo L, Arendt H, Kim HJ, Lee JH, Pugach P, Williams M, Debnath G, Moldt B, van Breemen MJ, Isik G, Medina-Ramírez M, Back JW, Koff WC, Julien J-P, Rakasz EG, Seaman MS, Guttman M, Lee KK, Klasse PJ, LaBranche C, Schief WR, Wilson IA, Overbaugh J, Burton DR, Ward AB, Montefiori DC, Dean H, Moore JP. HIV-1 VACCINES. HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. *Science* 2015; 349: aac4223
- ¹³ Kulp DW, Steichen JM, Pauthner M, Hu X, Schiffner T, Liguori A, Cottrell CA, Havenar-Daughton C, Ozorowski G, Georgeson E, Kalyuzhniy O, Willis JR, Kubitz M, Adachi Y, Reiss SM, Shin M, de Val N, Ward AB, Crotty S, Burton DR, Schief WR. Structure-based design of native-like HIV-1 envelope trimers to silence non-neutralizing epitopes and eliminate CD4 binding. *Nat Commun* 2017; 8: 1655
- ¹⁴ Peterhoff D, Wagner R. Guiding the long way to broad HIV neutralization. *Curr Opin HIV AIDS* 2017; 12: 257–264
- ¹⁵ Steichen JM, Kulp DW, Tokatlian T, Escolano A, Dosenovic P, Stanfield RL, McCoy LE, Ozorowski G, Hu X, Kalyuzhniy O, Briney B, Schiffner T, Garces F, Freund NT, Gitlin AD, Menis S, Georgeson E, Kubitz M, Adachi Y, Jones M, Mutafyan AA, Yun DS, Mayer CT, Ward AB, Burton DR, Wilson IA, Irvine DJ, Nussenzweig MC, Schief WR. HIV Vaccine Design to Target Germline Precursors of Glycan-Dependent Broadly Neutralizing Antibodies. *Immunity* 2016; 45: 483–496