



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 824**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04803279 .1**

96 Fecha de presentación : **05.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1748789**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2007**

54 Título: **IL-22 para prevenir enfermedades infecciosas.**

30 Prioridad: **05.11.2003 US 517104 P**
21.06.2004 US 580720 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

73 Titular/es: **Institut de Recherche Pour le
Développement (IRD)**
213, rue La Fayette
75480 Paris Cédex 10, FR
IMMUNOCLIN Ltd.

72 Inventor/es: **Veas, Francisco;**
Misse, Dorothée;
Clerici, Mario y
Trabatoni, Daria

74 Agente: **Ruo Null, Alessandro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

[0001] La invención se refiere a biomarcadores de resistencia a infecciones en seres humanos y aplicaciones biológicas de los mismos, particularmente en el diagnóstico, profilaxis y terapia.

[0002] Se refiere a biomarcadores de resistencia a infecciones debidas a patógenos en general, particularmente a infecciones debidas a virus y retrovirus y, más particularmente, a infecciones por VIH.

[0003] Surgieron varias enfermedades virales a finales del siglo veinte, particularmente el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Más de dos décadas después de su descubrimiento, la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es todavía una carga importante por razones sanitarias, sociales y económicas en todo el mundo. Durante 2002, se registraron 3,1 millones de muertes, mientras que se registraron aproximadamente 5 millones de nuevos casos de infección. Más de 40 millones de personas están infectadas en todo el mundo y existe la urgente necesidad de encontrar agentes para prevenir la propagación de este virus, así como para mejorar el régimen de tratamiento actual. Hasta la fecha, se ha recurrido tanto al repertorio genético del hospedador, como a las respuestas inmunes innatas y adquiridas, como a mutaciones o atenuaciones virales para explicar la mayor o menor susceptibilidad individual a la infección. Se han realizado grandes progresos en la comprensión del mecanismo de entrada del virus de la inmunodeficiencia humana en células diana. Descubrimientos de referencia tales como la identificación de correceptores virales y de la estructura de la proteína de la envuelta viral (Env) unida a su receptor proporcionaron importantes nuevas percepciones de cómo Env media la fusión de las membranas viral y celular como se describe en la **Fig. 1**.

[0004] La existencia de algunas personas en parte “inmunes” a la infección, a pesar de tratar con una exposición a VIH repetida, así como la progresión extremadamente lenta de la enfermedad en algunos individuos infectados por VIH, ofrece pistas valiosas para elucidar los mecanismos que subyacen a la resistencia natural al VIH. Sorprendentemente, ambas de dichas cohortes, los individuos denominados Seronegativos Expuestos, No Infectados Expuestos (ESN, EU) y los de Progresión Lenta, Progresión a Largo Plazo (SP, LTNP) tienen respuestas inmunes comunes, por ejemplo, la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra dianas comunes, que pueden desempeñar un papel protector en la entrada y/o propagación del virus.

[0005] En 1989 un artículo por Ranki describió un fenómeno curioso: podía detectarse respuesta de células T específica de VIH contra VIH, gp 120 nativa y proteínas de la envuelta y del núcleo recombinantes en las parejas sexuales negativas para antígeno y anticuerpo de hombres positivos a VIH conocidos. Otros dos informes confirmaron esa observación inicial y los autores plantearon la posibilidad de que una exposición a VIH que no diera como resultado seroconversión e infección estaría asociada con la sensibilización exclusiva de linfocitos T auxiliares [2]. Análisis realizados en diferentes cohortes de individuos con alto riesgo de infección por VIH, e incluyendo trabajadores de asistencia sanitaria expuestos por vía parenteral al VIH y neonatos sanos de madres infectadas por VIH, pusieron de manifiesto que estaban presentes células T auxiliares específicas de VIH, pero no anticuerpos, en todos estos sujetos. Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que una exposición viral que de como resultado la sensibilización exclusiva de células T específicas de VIH podría estar asociada con una protección contra una infección por VIH real. Esta hipótesis se vio enormemente reforzada por tres trabajadores sexuales comerciales en Nairobi (la cohorte de Pumwaani), que claramente demostraron que mientras que la mayoría de mujeres que empezaban a prostituirse se infectaban por VIH en el plazo de un año, una minoría considerable, que posteriormente se estimó que era de aproximadamente 15% de los individuos ensayados, era claramente resistente a la infección. 2) Sarah Rowland-Jones demostró la presencia de CTL específicos de VIH en neonatos sanos de madres infectadas por VIH. La detección de linfocitos T CD8 secretores de IFN α específicos de VIH en estos neonatos fue un punto de inflexión en el entendimiento de que la exposición a VIH no asociada con seroconversión está asociada con una infección frustrada real y que el virus replicante es de hecho responsable de la estimulación de una inmunidad específica. De hecho, solamente la infección real con el virus daría como resultado la presentación de antígenos virales en asociación con moléculas de HLA de clase I y la inducción de una respuesta inmune mediada por CD8. (Mucho después, el papel protector de la inmunidad mediada por células en este entorno se vio reforzado adicionalmente por la observación de que la seroconversión tardía que se producía en trabajadores sexuales resistentes al VIH keniatas que interrumpían el trabajo sexual comercial durante un periodo de tiempo estaba relacionada con la disminución de respuestas CD8+ específicas de VIH debida a una exposición a antígeno reducida). 3) Los experimentos en los que se expuso a macacos *in vivo* a dosis subinfecciosas de VIS y en los que se detectaron células T auxiliares específicas de VIS, demostraron protección frente a exposiciones posteriores a dosis infecciosas del mismo virus (estos resultados no fueron inequívocamente confirmados por otros investigadores).

[0006] Había nacido el campo de la investigación de correlaciones inmunes de protección frente a la infección por VIH. Informes fundamentales posteriores demostraron que en individuos expuestos a VIH pero no infectados: 1) podría estar presente un fondo genético particular, tipificado por la delección 32 en el receptor CCR5; 2) se aumenta la producción de factores solubles, incluyendo factores antivirales celulares (CAF), quimiocinas beta y defensinas alfa; 3) pueden detectarse secretores de IgA específica de VIH, así como auxiliares T y CTL en fluidos cervico-vaginales y eyaculados [19], y 4) la actividad de células NK es particularmente potente [2]. Por lo tanto, 15 años después de la primera descripción de la detección de células T auxiliares específicas de VIH en individuos seronegativos, la posible resistencia a infección por VIH puede resumirse como correlacionada con la inducción de inmunidad mediada por células de la mucosa y sistémica, e IgA restringida a la mucosa, posiblemente dentro de entornos de inmunidad natural

y genética favorables.

Tabla 1. Mecanismos que se sugiere que están asociados con la resistencia a la infección por VIH

Mecanismos adquiridos	Mecanismos genéticos	Inmunidad innata
Células T auxiliares específicas de VIH	Deleción en los correceptores del VIH-1	Actividad de NK elevada
CTL específicos de VIH	Alelos de HLA particulares	Producción elevada de quimiocinas β
IgA específica de VIH de la mucosa		Producción elevada de CAF
Anticuerpos anti-CD4		Concentración elevada de α defensinas
Anticuerpos anti-CCR5		

- 5 [0007] La comprensión de los mecanismos de resistencia natural contra la infección por VIH puede tener implicaciones para la identificación de nuevas estrategias antivirales y, en particular, para el desarrollo de diagnósticos, terapias y diseños de vacuna innovadores.
- 10 [0008] Los inventores han comparado estudios sobre los perfiles proteicos (proteoma) y la expresión del genoma (transcriptoma) de individuos expuestos a VIH no infectados (EU), individuos expuestos a VIH e infectados (VIH+) y donantes sanos (HC) para identificar biomarcadores de EU que pudieran explicar los mecanismos de resistencia contra la infección por VIH.
- 15 [0009] Los inventores han identificado una citocina clave que parece ser responsable de la inducción de proteínas implicadas en la resistencia a virus.
- [0010] También han descubierto que otra citocina muestra un polimorfismo entre las cohortes estudiadas que muestran un patrón particular en EU. Después, también parecían estar implicadas otras isoformas en procesos de resistencia al VIH por su efecto sobre receptores FPR o FPRL1 y la posterior fosforilación de correceptores de VIH CCR5 o CXCR4. Después, la combinación de estas citocinas se consideró como un elemento que participaba indirectamente en el bloqueo de la infección viral. Individualmente y en combinación, también parecen participar en los *mecanismos* de resistencia al VIH.
- 20 [0011] La invención se refiere a IL-22 para su uso en la prevención de enfermedades infecciosas mediante el inicio de una respuesta inmune innata.
- 25 [0012] Las proteínas de una respuesta inmune innata, incluyendo IL-22, la ruta de Jack/STAT, SOCS3, beta defensinas (2 y 3) y la apolipoproteína de fase aguda amiloide sérico Ac o A-SAA, o un fragmento del mismo, citocina IL-8 e isoformas de la misma, son de gran valor en aplicaciones biológicas en vista de sus propiedades como biomarcadores de resistencia a infecciones por VIH. Particularmente, son de gran interés en el diagnóstico, la terapia y la profilaxis.
- [0013] En el uso mencionado anteriormente una cantidad eficaz de IL-22 está en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- [0014] Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan ventajosamente para su administración por la vía oral, intramuscular, intravenosa o mucosa.
- 30 [0015] Para la administración oral, se presentan en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, gotas, parche o pulverización.
- [0016] Para su administración por inyección, las composiciones farmacéuticas están en forma de solución para inyección por la vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, producida a partir de una solución, o suspensión o emulsión estéril o esterilizable.
- 35 [0017] Para su administración por vía mucosa, las composiciones farmacéuticas están en forma de geles.
- [0018] Las dosis de administración se ajustarán fácilmente por un experto en la materia dependiendo del estado del paciente.
- 40 [0019] De acuerdo con otro aspecto más, la invención se refiere a un método para favorecer la resistencia innata del hospedador a infecciones virales, que comprende usar IL-22 como citocina iniciadora auxiliar de la respuesta inmune innata a infecciones.

[0020] Otras características y ventajas de la invención se proporcionarán en los siguientes ejemplos y con referencia a las figuras 1 a 10, que representan, respectivamente:

- Figura 1: Diferentes etapas de la unión de la envuelta viral a receptores celulares,
- Figura 2: Perfil proteico de SELDI-TOF de individuos de diferentes cohortes,
- Figura 3: Efectos inhibidores sobre la infección por VIH-I de la cascada de infección en EU,
- Figura 4: Reducción de la proteína de aproximadamente 8,6 kDa usando un Mab anti-A-SAA,
- Figuras 5 y 6: RT-PCR comparativa de IL-8 (Figura 5) e IL-22 (Figura 6) de individuos de diferentes cohortes,
- Figura 7: Validación por Western de análisis de SAGE de individuos de diferentes cohortes,
- Figura 8: Inducción de la fosforilación del correceptor CCR5 de VIH-1 por la unión de la proteína de fase aguda SAA al receptor FPR,
- Figura 9: Infectividad de VIH-1 R5 de células dendríticas inmaduras,
- Figura 10: Perfil de SELDI-TOF de preparación de SAA que muestra el fragmento de $\approx 8,6$ kDa.

Materiales y Métodos

Incorporación al estudio de individuos expuestos no infectados (EU)

[0021] Se inscribieron en el estudio individuos expuestos a VIH pero no infectados. En cada caso el ESN era la pareja sexual de un paciente infectado por VIH; en cada pareja se describió una historia prolongada de relaciones sexuales con penetración sin preservativo (y sin otros factores de riesgo conocidos). Los criterios de inclusión en EU eran una historia de múltiples episodios sexuales sin protección durante al menos cuatro años con al menos cuatro episodios de relación sexual de riesgo en los 4 meses anteriores al periodo de estudio. Los EU eran repetidamente seronegativos para VIH por los métodos de carga de ARN viral y cultivo. También se inscribieron en el estudio individuos infectados por VIH y controles sanos. Los pacientes de VIH y los HC eran de la misma edad y sexo que los EU. Se había realizado un seguimiento longitudinal de todos los individuos EU, VIH+ y HC durante al menos 4 años (anteriores al periodo de estudio) por el Departamento de Enfermedades Infecciosas, Santa Maria Annunziata Hospital en Florencia. Esto permitió a los inventores excluir del estudio a los ESN y HC en los que se hubieran descrito en ese periodo de tiempo enfermedades de transmisión sexual o cualquier otra patología. Los EU se caracterizaron basándose en la presencia de alelos CCR5- $\Delta 32$; se detectó una delección heterocigota en 1 individuo. Todos los pacientes EU, VIH e individuos no infectados de bajo riesgo accedieron a donar células mononucleares de sangre periférica.

Células

[0022] Se llevaron a cabo estudios comparativos de proteómica y transcriptómica en células T de EU y VIH+ que formaban parejas discordantes que tenían relaciones sexuales sin protección frecuentes o inyección de droga invasiva por intercambios de jeringa. Las células T de los HC eran los controles de estos análisis. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de las 3 cohortes: HC, EU y VIH+, y se separaron sobre Ficoll-Hypaque, se cultivaron a corto plazo (6 días) (Yssel, H. y Spits, H, en Current Protocols in Immunology, Capítulo 7.19), después, los linfocitos T (CD4+ y CD8+) se activaron con CD3/CD28 y se cultivaron en RPMI complementado con 10% de FCS. En resumen, para activar el complejo CD3-TCR, se usaron 10 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo monoclonal (MAb) anti-CD3 SPV-T3b para recubrir placas de 24 pocillos durante 4 h a 37°C. Posteriormente, se depositaron 106 células en estos pocillos recubiertos en presencia de medio cultivo (medio de Yssel, Irvine scientific, Santa Ana, CA) que contenía 1% de suero humano AB+ y 1 $\mu\text{g/ml}$ de MAb anti-CD28 L293. Se realizaron tres activaciones de linfocitos T a los tiempos de, respectivamente, 2, 6 y 18 h. Las células activadas se combinaron a partir de 5 individuos por cohorte (que tenían cada uno un número equivalente de células y ARN total, **Tabla 2**) para estudios de expresión génica de células T que se llevaron a cabo usando el Análisis en Serie de la Expresión Génica (SAGE, Velculescu 1995). Posteriormente, se congeló un conjunto de ARN total de cada individuo de la combinación para usarse adicionalmente para validar individualmente los resultados del SAGE. También se usó un conjunto de estas células para realizar análisis de transferencia de Western y Power (véase a continuación). Se analizaron las proteínas solubles presentes en el plasma de individuos (n = 25, **Tabla 2**) de 3 cohortes mediante la estrategia de SELDI-TOF CIPHERGEN™.

[0023] Se obtuvieron células dendríticas de monocitos de donantes sanos. En resumen, se procesó una capa leucoplaquetaria para obtener monocitos altamente purificados que se cultivaron en medio DMEM complementado con 10% de FCS en presencia de 10 ng/ml de IL-4 y 150 ng de GM-CSF (Becton y Dickinson) durante 7 días, hasta obtener Células Dendríticas inmaduras (iDC) bien caracterizadas usando MAb apropiados (MAb anti-señal DC, anti-CD1a, anti-CD83 y anti-CD86) que mostrasen también la presencia del tipo receptor de formil péptido 1 (FPR1) (un receptor que pertenece a la familia del receptor de formil péptido (FPR)). Se mantuvieron las células a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ 5%.

Anticuerpos y Reactivos

[0024] Se adquirieron IL-22 humana recombinante, Ab policlonal anti-CCR5, policlonal anti-IL-22 humana en R & D Systems (Oxon, Reino Unido), se adquirieron las proteínas amiloide sérico A (A-SAA) e IL-8 en Peprtech (Rocky Hill, NJ), se obtuvo MIP-1 β de Françoise Baleux (Pasteur Institute, París, Francia), se adquirió MAb Anti-IL-8 en Bender, se adquirieron MAb Anti-CXCR4, Anti-SAA 1 y 2 (Biosource), MAb Anti-SAA (Calbiochem), Ab policlonal Anti-Stat-1 activa, MAb anti-Stat1, Ab policlonal Anti-Stat-3 activa, pAb Anti-Stat-3, Ab policlonal Anti-Stat-5 activa, MAb Anti-Stat-5 en Becton and Dickinson (Palo Alto, CA). El Ab policlonal anti-SOCS 3 (Santa Cruz laboratories, Santa Cruz, CA).

Análisis plasmático mediante la estrategia de SELDI-TOF en microplacas de proteínas

[0025] Antes de analizar, se centrifugaron las muestras de plasma a 13000 rpm durante 15 min, el sedimento se desechó y se diluyó el sobrenadante (1:10) en tampón de unión optimizado (BB: NaCl 0,250 M Hepes 50 mM, pH 7,5). Las muestras de plasma diluidas se aplicaron durante 1 h sobre el intercambiador aniónico fuerte previamente saturado (SAX2) Protein-chips™ durante dos baños con BB de 5 min. Las proteínas no unidas se eliminaron por lavado usando sucesivamente 3 lavados de 5 min con el tampón de lavado (WB: NaCl 1 M, Hepes 50 mM, pH 7,5) y un lavado final usando 5 μ l de agua bidestilada pura. Las proteínas capturadas en microplacas se secaron al aire posteriormente a temperatura ambiente (RT) antes de cubrirlas con una matriz (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinapínico (SPA) en acetónitrilo 99,9% y ácido trifluoroacético 0,1%) para absorber la energía láser. Las muestras preparadas con matriz se secaron a RT. Estas muestras recibieron después una media de 100 dosis de láser a tiempo real para la desorción de las proteínas capturadas a una intensidad de láser que variaba de 10.000 hasta 40.000 dosis (unidades arbitrarias) para generar un espectro proteico (proteograma). Las proteínas ionizadas y desorbidas se detectaron y sus masas moleculares señaladas en las imágenes del proteograma se determinaron usando análisis de TOF con el software Protein-Chip Biology System II (PBS II; Ciphergen) y el software Ciphergen Peaks. La relación de masa respecto a carga (m/z) de cada proteína capturada por la superficie de microplaca se determinó de acuerdo con patrones calibrados externamente: Angiotensina humana I (1,2965 kilodaltons, kDa), ACTH humana (2,9335 kDa), α -endorfina humana (3,4650 kDa), insulina bovina (5,7336 kDa) y ubiquitina bovina (8,5648 kDa).

Reducción de la proteína de ~8,6 kDa a partir de plasma de EU

[0026] Se añadieron veinticinco microlitros de perlas magnéticas (Dynal) lavadas 3 veces con 1 ml de PBS a 25 μ g de MAb anti-A-SAA (SAA-1 y SAA-2) de Clinisciences concentrados a 100 μ g/ml y se incubaron durante 18 h a 4°C con agitación orbital. Las perlas recubiertas con MAb anti-A-SAA se lavaron posteriormente 3 veces con 1 ml de PBS. Después se añadieron quinientos microlitros de plasma de EU y se incubaron a 37°C durante 3 h en agitación. Este sobrenadante de plasma se volvió a analizar después usando la microplaca de Ciphergen apropiada. Se aplicaron cinco microlitros de EU preincubados o no con MAb anti-A-SAA 1 y 2 y se analizaron como se ha indicado anteriormente mediante SELDI-Tof (Ciphergen™).

Inhibición de la infección por VIH-1 mediante proteína A-SAA recombinante

[0027] Antes de la infección por VIH-1 se incubaron células iDC durante 1 h a las concentraciones designadas con la apolipoproteína humana de fase aguda amiloide sérico A (SSA de Peprtec™), que es un agonista de FPRL1. Posteriormente, las células se infectaron con VIH-1 ADA o HXB2 a una MOI de 0,1 durante 2 horas. Las células se lavaron minuciosamente y se incubaron en medio completo. Se determinaron los niveles de p24 de VIH-1 por ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (Beckman-Coulter, Francia) 4 días después de la infección.

Análisis de SAGE

[0028] El SAGE se realizó esencialmente como se resume en el protocolo detallado de Velculescu que puede obtenerse en la URL: WWW.sagenet.org con las modificaciones de Powell y Kenzelmann.

Análisis de Transferencia Power

[0029] El análisis de inmunotransferencia de proteínas se llevó a cabo como se describe (www.translab.com/shtml). En resumen, se lisaron células T estimuladas con CD3/CD28 de las 3 cohortes mediante el tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7,4, ortovanadato de Na⁺ 1 mM, SDS 1%), se sonicaron y aclararon por centrifugación. Las proteínas se hicieron migrar en geles de poliacrilamida-SDS con gradiente de 5-15% para detectar una amplia variedad de tamaños de proteínas en un gel. Se cargaron cuatrocientos microgramos de proteína en pocillos largos por toda la anchura del gel. Esto se traduce en casi 15 μ g de proteína sometida a electroforesis por carril en un gel de 25 pocillos convencional. Posteriormente, el gel se transfirió a una membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) durante una noche. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 h con leche 5%. Posteriormente, la membrana se insertó en un colector de transferencia de Western que aísla 45 canales por toda la membrana. En cada canal, se añadieron diferentes cócteles de anticuerpos complejos y se dejaron hibridar durante 1 h. Después de la tinción, las membranas se lavaron y se hibridaron durante 30 min con secundario de cabra anti-ratón con peroxidasa de rábano picante (HRP). Todos los anticuerpos eran monoclonales de ratón. Las membranas se lavaron y se revelaron con SuperSignal West Pico (Pierce, Santa Clara, CA).

Análisis por RT-PCR

[0030] El ARN total, aislado de células T activadas, se convirtió por transcripción inversa en ADNc. Para cada transcripción inversa de muestra de ARN total a 42°C durante 50 min, se usaron los siguientes reactivos: 1 µg de ARN total y 200 unidades de transcriptasa inversa Superscript II (RT, Gibco-BRL); tampón de RT según se suministró; 5 ditiotreitól 100 mmol/l (DTT), 40 unidades de Rnasin (Promega, Madison, WI, Estados Unidos); 1,25 mmol/l de cada dNTP; y 500 ng de oligo dT. Se realizó la PCR de la forma siguiente: 2 µl de ADNc; 1,25 mmol/l de cada dNTP, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Promega); MgCl₂ 2,5 mmol/l, 2,5 µl de tampón 10X y 20 pmol de cada pareja de cebadores específicos en un volumen total de 25 µl. Se usaron los cebadores específicos siguientes: IL-22: SEC ID N° 1 sentido 5'-TGACAAGTCCAACCTCCAGCAG-3', SEC ID N° 2 antisentido 5'-TCTGGATATGCAGGTCATCACC-3'; IL-8: SEC ID N° 3 sentido 5'-AACTTCTCCACAACCCTCTG-3', SEC ID N° 4 antisentido 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATT-3'; GAPDH: SEC ID N° 5 sentido 5'-CCA-CCC-ATG-GCA-AAT-TCC-ATGGCA-3' y SEC ID N° 6 antisentido 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'. Después de una preincubación (94°C, 5 min), cada muestra de PCR se sometió a un régimen de amplificación de 29 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), hibridación de cebadores (56°C, 1 min) y extensión de cebadores (72°C, 1 min) con una extensión final (72°C, 10 min).

Análisis de transferencia de Western

[0031] Se lisaron un millón de células T activadas con CD3/CD28 (como se ha indicado anteriormente) de cada cohorte (HC, EU y VIH+) en un tampón NP40 1%. Para cada grupo, se sometieron a electroforesis cantidades equivalentes de proteína en condiciones reductoras y se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron durante 30 min en TBS (NaCl 50 mmol/l, Tris HCl 20 mmol/l, pH 7,5) que contenía BSA 5% y Tween 20 0,1%, y después se incubaron durante una noche a 4°C con un anticuerpo primario. Las proteínas se visualizaron usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las transferencias se lavaron en TBS que contenía Tween 20 0,1% y se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón o anti-conejo conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Para volver a realizar una inmunotransferencia con otro anticuerpo, los filtros se sometieron a separación como se ha descrito anteriormente [10].

Evaluación de la fosforilación de correceptor de VIH-1

[0032] Se estimularon células dendríticas inmaduras con MIP-1β o con el A-SAA de fase aguda (Peprotec™) a las concentraciones indicadas (en la Fig. 7) durante los periodos de tiempo indicados a 37°C. Después, las células se lisaron después de 20 min en hielo con mezcla periódica en tampón de lisis (Triton-X-100 1%, Tris HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 137 mM, glicerol 15%, EDTA 5 mM) que contenía inhibidores de fosfatasa (fluoruro de fenilsulfonilo 1 mM, aprotinina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, ortovanadato sódico 1 mM, EGTA 1 mM). Los lisados celulares se limpiaron previamente con 30 µl de perlas de proteína A Sepharose lavadas (15 µl de perlas envasadas) a 4°C durante 1 h y se añadió 1 µg de anticuerpo policlonal anti-fosfoserina (BD) a 200 µg de lisados celulares. La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante una noche. El inmunocomplejo se capturó añadiendo 50 µl de perlas de proteína A Sepharose lavadas (25 µl de perlas envasadas). La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 2 horas adicionales. Las perlas se centrifugaron (10 s a 14000 rpm), se escurrió el sobrenadante, se lavaron 3 veces con tampón IP 1X helado, después se resuspendieron en 30 µl de tampón de muestras de Laemli 2X y se llevaron a ebullición durante 5 min para eluir el inmunocomplejo. Después de la electroforesis en gel prefabricado de SDS-PAGE 10% (Invitrogen), las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se visualizó el CCR5 usando un policlonal anti-CCR5 (R & D Systems) y el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Matrices Searchlight™ de quimiocina humana

[0033] Se analizaron cuatro plasmas diferentes de cada cohorte estudiada siguiendo las instrucciones del fabricante de las matrices de quimiocina Searchlight (Pierce Endogen, Perbio, Boston) para determinar el contenido en plasma de 8 quimiocinas.

Resultados

[0034] A pesar de estar repetidamente expuestos al virus de la Inmunodeficiencia Humana de Tipo I (VIH-1) por las vías sexual o sistémica ciertos individuos continúan sin estar infectados. Para investigar los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia a la infección por VIH-1, los inventores han realizado un estudio comparativo sobre células T de sangre periférica activadas con CD3/CD28 (para potenciar la señalización celular y la expresión génica) y plasma (para estudiar sus proteínas solubles) de cohortes de individuos expuestos a VIH-1 no infectados (EU), sus parejas sexuales infectadas por VIH-1 y controles sanos (Tabla 2).

n°	categoría	pareja VIH+ de cada EU	carga viral	CD4
EU		VIH+		

nº	categoría	pareja VIH+ de cada EU	carga viral	CD4
1	EU1	VIH+ 20	460	348
2	EU2	VIH+ 21	<400	244
3	EU3	VIH+ 22	400	327
4	EU4	VIH+ 23	9420	328
5	EU5	VIH+ 24	9440	916
6	EU6	VIH+ 18	<50	205
7	EU7	VIH+ 25	750000	16
8	EU8	VIH+ 26	2070	636
9	EU9	VIH+ 27	399	101
10	EU10	VIH+ 28	750000	424
11	EU11	VIH+ 9	<50	673
12	EU12	VIH+ 29	<50	
13	EU13	VIH+ 16	<50	472
14	EU14	VIH+ 19	<50	1220
15	EU15	VIH+ 13	<50	321
16	EU16	VIH+ 30	<400	385
17	EU17	VIH+ 31	>750000	49
18	EU18	VIH+ 32	400	339
19	EU19	VIH+ 33	<50	
20	EU20	VIH+ 34	400	327
21	EU21	VIH+ 35	350000	166
HC				
1	HC1		VIHneg	
2	HC2		VIHneg	
3	HC3		VIHneg	
4	HC4		VIHneg	
5	HC5		VIHneg	
6	HC6		VIHneg	
7	HC7		VIHneg	
8	HC8		VIHneg	
9	HC9		VIHneg	
10	HC10		VIHneg	
11	HC11		VIHneg	

nº	categoría	pareja VIH+ de cada EU	carga viral	CD4
12	HC12		VIHneg	
13	HC13		VIHneg	
14	HC14		VIHneg	
15	HC15		VIHneg	
16	HC16		VIHneg	
17	HC17		VIHneg	
18	HC18		VIHneg	
19	HC19		VIHneg	
20	HC20		VIHneg	
21	HC21		VIHneg	
22	HC22		VIHneg	

5 [0035] Se llevaron a cabo análisis de genómica, proteómica y señalización celular complementarios usando el Análisis en Serie de la Expresión Génica (SAGE), espectrometría de masas por desorción/ionización láser aumentada por superficie y tiempo de vuelo (SELDI-TOF, Ciphergen™) y Power blotting™, respectivamente (véase Sección de Materiales y Métodos 6). El entendimiento de la genética y la fisiología de los individuos EU y sin progresión a largo plazo (LTNP) con respecto a los mecanismos anti-virales naturales podría proporcionar la base del tratamiento contra la infección por VIH. Los inventores han estudiado después los mecanismos fisiopatológicos basándose en la ausencia de infección en individuos sometidos a exposiciones frecuentes a VIH en individuos EU.

10 [0036] Los primeros resultados obtenidos del alto número de marcadores genéticos (HC: 21193 marcadores, EU: 22697 marcadores y VIH+: 17.285 marcadores) de los análisis del transcriptoma por el método del SAGE mostraban que se descubrió que los EU sobreexpresaban **Th1 IL-22** y **SOCS1** y que la **Granzima B** estaba subexpresada en VIH+ en comparación con las cohortes de EU y HC, que mostraban niveles similares (**Tabla 3**). Estos resultados se obtuvieron por supuesto sin tener ninguna idea "a priori".

SAGE

15 Nivel de expresión génica

[0037]

GEN	HC	ESN	VIH +
IL-22	1	13	0
SOCS 1	0	3	0
Granzima B	3.91	3.96	0

Transferencia Power

Nivel de expresión de proteína

[0038]

20

PROTEÍNA	HC	ESN	VIH+
STAT3	0	5	0

[0039] En paralelo, usando el análisis de transferencia Power de proteínas de células T combinadas de las 3 cohortes, se detectó el **factor de respuesta de fase aguda STAT3**. Los análisis del plasma (usando la estrategia de SELDI-TOF)

de 25 individuos por cohorte han mostrado un aumento de la expresión de una proteína soluble de un PM de ~8,6 kDa, (Fig. 2).

[0040] Teniendo en cuenta que IL-22 inicia una cascada (Fig. 3) de respuesta inmune innata que incluye la ruta de Jack/STAT, SOCS 3, beta-defensinas y la apolipoproteína de fase aguda amiloide sérico A (A-SAA): SAA-1 y SAA2, estos datos se desarrollaron adicionalmente usando diferentes métodos para confirmar y ampliar su significación (véase la Sección de Materiales y Métodos). Sintetizado en el hígado y en otros tejidos como los epitelios de vasos sanguíneos, el ASAA se encuentra asociado a HDL y sin HDL en el plasma. El promotor de A-SAA es altamente sensible a citocinas inflamatorias tales como IL1 β , TNF α ; IFN γ e IL6 que pueden inducirse por LPS. Además, recientemente se ha mostrado que la citocina Th1 IL-22 es capaz de participar en la expresión de A-SAA. Estas observaciones han sugerido que el A-SAA podría desempeñar un papel como molécula de defensa innata inmune en sitios locales. La escisión postraduccional de A-SAA produce fragmentos C-terminales de aproximadamente 8,5 kDa de PM. Para identificar la proteína de ~8,6 kDa obtenida del análisis de SELDI-TOF, se usó un MAb anti-A-SAA específico antes de la generación de perfiles de SELDI-TOF en plasma y, como se muestra en la Fig. 4, la imagen correspondiente a ~8,6 kDa se redujo usando este MAb anti-A-SAA. Curiosamente, también se ha sabido que A-SAA es capaz de inducir la citocina IL-8, después se realizó una RT-PCR específica de IL-8 a partir de 5 individuos de cada cohorte para verificar que esta citocina caracteriza la cascada de los EU. La Figura 5 muestra claramente que la PCR evidencia un polimorfismo específico de IL-8 en EU en comparación con los otros 2 grupos (VIH+ y HC). También se realizó una RT-PCR específica de IL-22 (Fig. 6) en cada individuo que constituía las combinaciones y los inventores pudieron observar que solamente los EU sobreexpresan significativamente esta citocina Th1 importante.

[0041] Se realizaron otros controles y validaciones, de este modo se realizaron análisis de transferencia de Western sobre proteínas de muestras combinadas. También se observó en el grupo de EU que STAT1 y STAT3 estaban fosforiladas (Fig. 7A y 7B), mientras que STAT5 estaba regulada negativamente en los VIH+ pero con nivel de activación superior y equivalente en los grupos tanto HC como EU (Fig. 7C). La expresión de proteína SOCS3 (Fig. 7D), un gen de respuesta a STAT3, estaba regulada positivamente en los EU. Además, estos individuos EU mostraron sobreexpresión de alfa-defensinas. Además, se ha demostrado que IL-8 es capaz de desensibilizar correceptores del VIH a través de la familia de receptores FRP, y que Stat1 es necesaria para la inhibición mediada por factor antiviral celular (CAF) de la activación de la repetición terminal larga (LTR) de VIH-1 y de la replicación del VIH.

[0042] Por lo tanto, los agonistas de FPR y FPRL1, A-SAA soluble, el péptido WKYMWWm, el péptido quimiotáctico bacteriano fMLF, y probablemente su fragmento de ~8,6 kDa, inducen fosforilación, como se muestra en los experimentos de los inventores usando A-SAA en transferencias de Western específicas (Fig. 8), y modulación negativa de ambos correceptores del VIH-1 CCR5 y CXCR4 a través de la activación de FPR. Después, como se ha descrito [31, 38], se ha demostrado que la proteína A-SAA inhibía la infección por VIH-I (Fig. 9). El A-SAA adquirido en Peprotec™ usado en estos ensayos muestra el fragmento de ~8,6 kDa (Fig. 10).

[0043] Estos resultados permitieron identificar una cascada de acontecimientos que favorecen la resistencia innata del hospedador a la infección por VIH que caracteriza a los EU. Puesto que IL-22 es capaz mediante JAK/STAT de inducir las beta-defensinas, A-SAA y que el A-SAA induce la secreción de la expresión de IL8, estos resultados representaron claramente esta cascada. Además, se ha demostrado que la IL-8 y la β -defensina disminuyen la infección por VIH-1. En conjunto los resultados de los inventores muestran que IL-22 es una citocina iniciadora auxiliar de la respuesta inmune innata que proporciona mecanismos de resistencia a la infección por VIH (Fig. 2).

[0044] Además, el análisis de SAGE muestra curiosamente que la Granzima B estaba regulada negativamente en los VIH+ pero se mantenía en los individuos EU y HC. Esto confirma la observación de la pérdida de granzima realizada en individuos tratados con VIH-HAART [2, 3]. Los inventores también han observado en el análisis de SAGE una mayor producción de IFN-gamma en EU que en HC y VIH+. Esta es una citocina típicamente antiviral que se ha encontrado en algunos estudios en EU realizados por otros.

[0045] Teniendo en cuenta que se descubrió que la cascada de acontecimientos inducía varios elementos principales de la inmunidad innata, el alcance de la invención también abarca otros virus y retrovirus distintos del VIH.

[0046] También se considerará que los EU mostraban mayores cantidades de STAT1 fosforilada y que, de forma importante, este elemento es esencial para la actividad de los "factores antivirales celulares" (CAF) secretados por células T CD8. También se ha demostrado que los VIH+ parecen perder las Granzimas B en comparación con los EU y HC. Las Granzimas B se producen por células T CD8 y NK para destruir las células infectadas. La producción dependiente de STAT-1 de los CAF Granzimas B desempeña un papel principal en la actividad anti-VIH en personas que resisten al desarrollo del SIDA a pesar de su infección por VIH.

[0047] También se ha observado en el análisis de SAGE que hay una mayor producción de IFN-gamma en los EU que en los HC y VIH+. Esta citocina es típicamente antiviral.

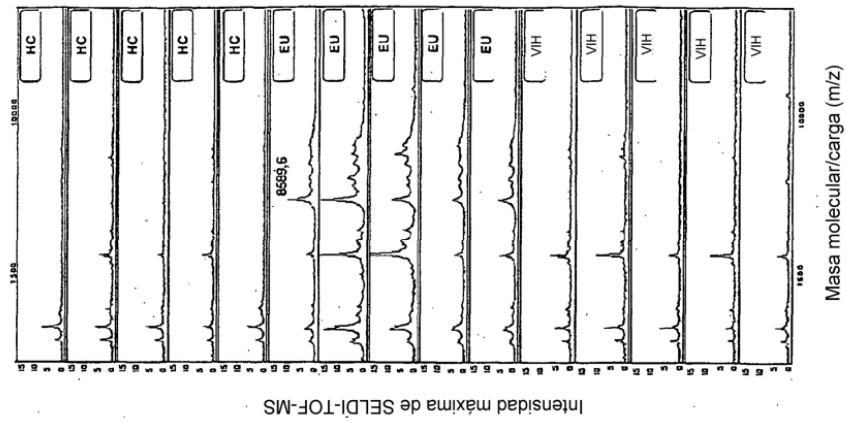
[0048] Estos elementos de cascadas deberían estar implicados, no sólo como elementos de resistencia a la infección viral, sino también como elementos de resistencia a la enfermedad inducida.

REIVINDICACIONES

1. IL-22 para usar en la prevención de enfermedades infecciosas por inicio de una respuesta inmune innata.
2. IL-22 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que IL-22 está en forma de citocina en asociación con un vehículo farmacéuticamente inerte.
- 5 3. IL-22 para usar de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que los fármacos están en formulaciones para aplicaciones orales o en la mucosa o por inyección.
4. IL-22 para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en la que, para su aplicación oral, los fármacos se presentan en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, gotas, parches o pulverizaciones.
- 10 5. IL-22 para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en la que para su aplicación por inyección, los fármacos están en forma de solución para inyección por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular producida a partir de una solución, o suspensión o emulsión estéril o esterilizable.
6. IL-22 para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en la que, para su aplicación en la mucosa, los fármacos están en forma de geles.

Figura 2

Figura 2: Perfil proteico de SELDI-TOF (Ciphergen™) de individuos de diferentes cohortes (HC: controles sanos; EU expuestos a VIH no infectados y VIH+: infectados por VIH) que muestra una proteína a 8,5896 kDa (~8,6 kDa) que se sobreexpresa en EU en comparación con otros grupos.



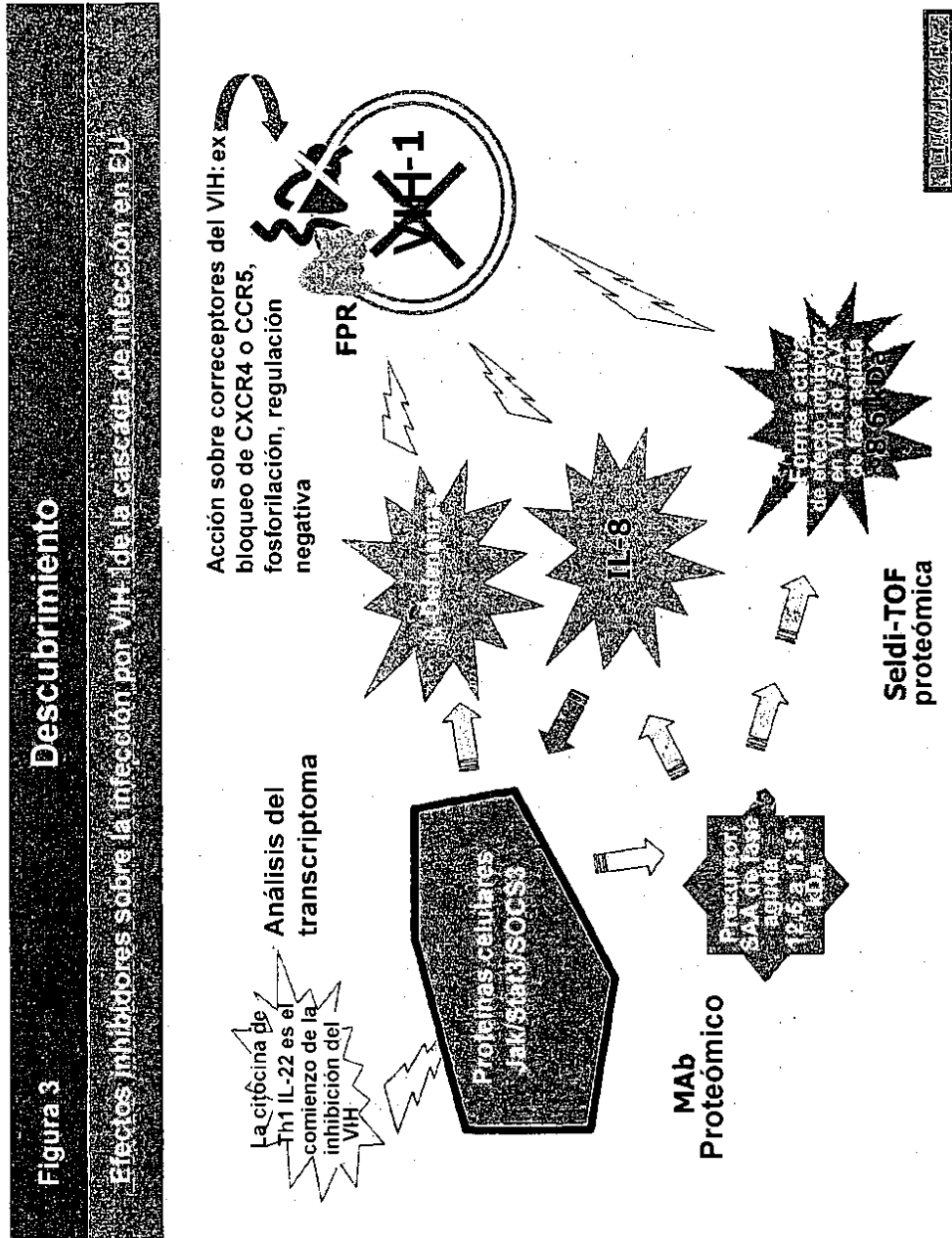
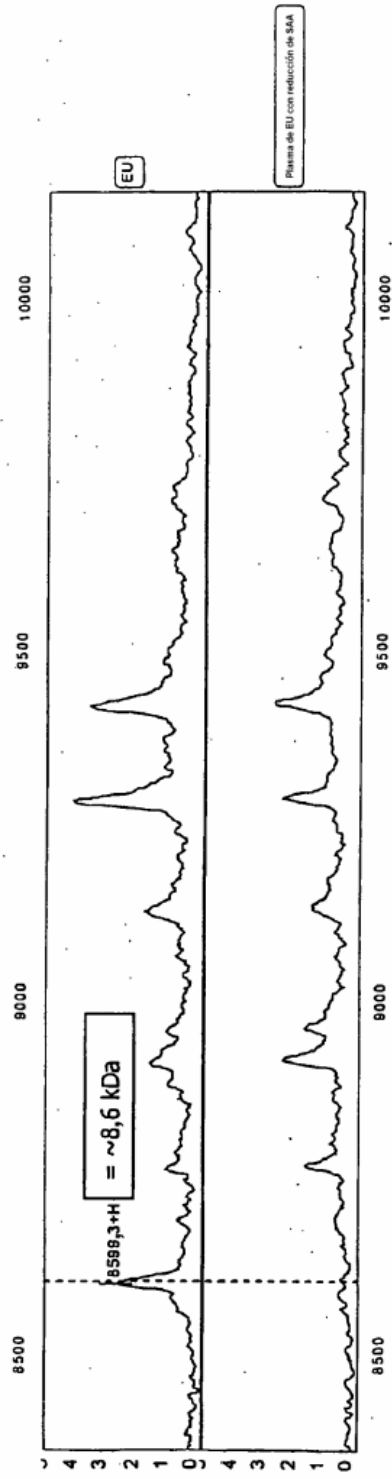
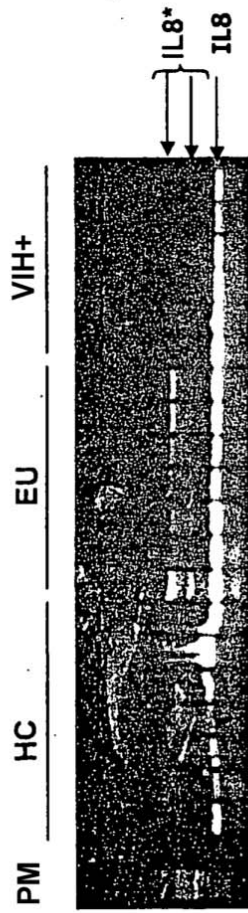


Figura 4



- 5 Fig. 4: El perfil proteico superior (proteograma) muestra la proteína de interés a 8599,3 kDa (~8,6 kDa) sobreexpresada entre los EU en comparación con parejas discordantes VIH+ y HC. Los MAb de rata anti-huSAA (Clinisciences AHA1011) reaccionan con las isoformas humanas SAA 1 y SAA 2 de la proteína de fase aguda, la apolipoproteína amiloide sérico A (SAA). Este MAb fue capaz de reducir completamente la proteína X después de la inmunoprecipitación de plasma de EU, indicando como se esperaba que la proteína X corresponde al fragmento activo de una fase de aguda de SAA.

Figura 5



*** Fragmentos de PCR adicionales específicos de IL8 de EU**

Figura 5: RT-PCR comparativa de individuos de diferentes cohortes

HC: controles sanos; EU expuestos a VIH no infectados y VIH+: infectados por VIH

Figura 6

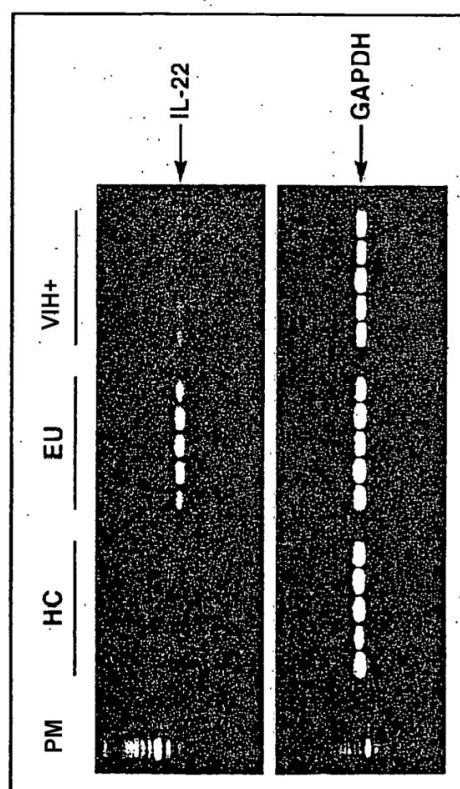


Figura 6: RT-PCR comparativa de individuos de diferentes cohortes
HC: controles sanos; EU expuestos a VIH no infectados y VIH+: infectados por VIH

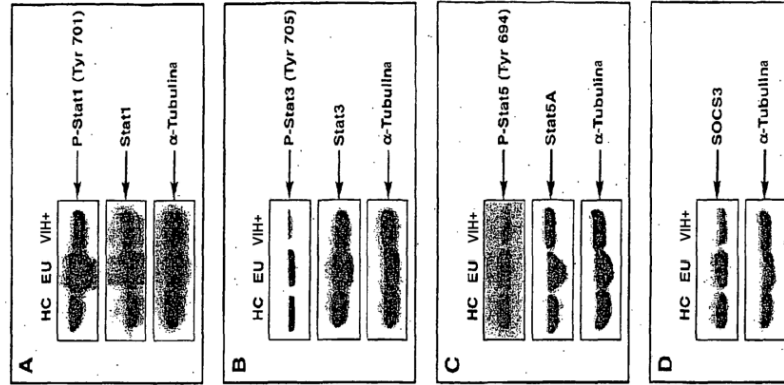


Figura 7

Figura 7: Validación por transferencia de Western de análisis de SAGE de individuos de diferentes cohortes (HC: controles sanos; EU expuestos a VIH no infectados y VIH+: infectados por VIH)

Figura 8

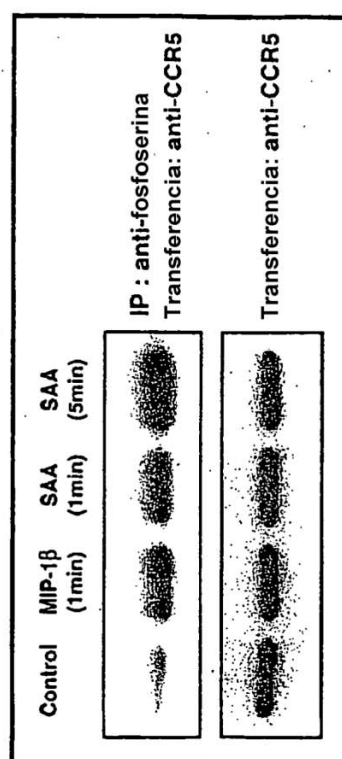


Figura 8: Fosforilación del coreceptor de VIH-1 CCR5 inducida por la unión de proteína SAA de fase aguda al receptor FPR

Figura 9

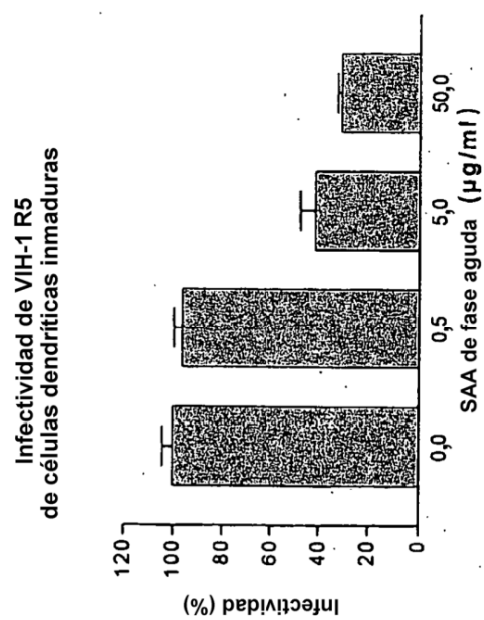


Figura 10

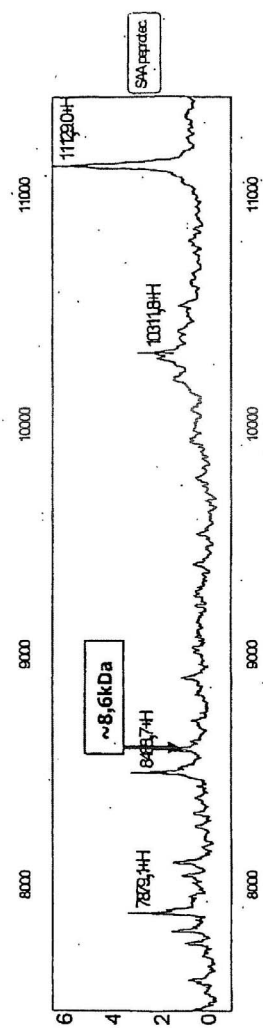


Figura 10: Perfil de SELDI-TOF de la preparación de SAA 1 y 2 de Peprotec™ que muestra el fragmento de ~8,6 kDa