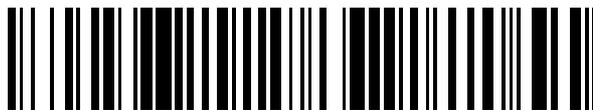


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 638**

21 Número de solicitud: 201330276

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

27.02.2013

30 Prioridad:

02.03.2012 US 61/606,017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.09.2013

71 Solicitantes:

**LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. (50.0%)
AV. MARE DE DÉU DE MONTSERRAT, 221
08041 BARCELONA ES y
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE
LA SIDA - CAIXA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GALLART GALLART, Teresa;
RODRIGUEZ GARCÍA, Marta y
CLIMENT VIDAL, Núria**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Método para determinar la probabilidad de contraer una infección por VIH**

57 Resumen:

La presente invención está dirigida a métodos para determinar la probabilidad de que un sujeto se infecte por VIH o se convierta en un paciente sin progresión a largo plazo tras la exposición a VIH basados en la determinación del número de copias del gen DEFA1A3. Asimismo, la presente invención se relaciona con kits que comprenden reactivos adecuados para la determinación del número de copias del gen DEFA1A3.

ES 2 421 638 A2

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la probabilidad de contraer una infección por VIH

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método y un kit diagnóstico para identificar sujetos capaces de controlar la evolución del VIH o prevenir la infección por VIH del todo.

10 **Antecedentes de la invención**

La resistencia innata a la infección por VIH es rara y muy variable entre diferentes individuos. A pesar de este hecho, algunos individuos se exponen al virus VIH pero permanecen sin infectar.

15 La mayor secreción de α -defensinas 1-3 (HNP 1-3) por las células dendríticas (CD) en individuos infectados por VIH se ha mostrado asociada con una menor velocidad de progresión a SIDA. Véase, Rodríguez-García M, *et al.*, PLoS ONE 2010; 5(2):e-9436. Las defensinas son péptidos antimicrobianos endógenos naturales con potente actividad anti-VIH. Según características estructurales, existen dos familias de defensinas en seres humanos, α -y β -defensinas, ambas con actividad anti-VIH. Los neutrófilos son la principal fuente celular de α -defensinas (es decir, péptidos de neutrófilos humanos HNP-1 y HNP-3), aunque otros subconjuntos de leucocitos también las producen. Aparte de su efecto directo anti-VIH, las α -defensinas 1-3 muestran múltiples actividades inmunostimulantes, incluyendo quimioatracción de células T indiferenciadas y células dendríticas inmaduras (CDin), inducción de la producción de citoquinas y quimioquinas y modulación de la expresión de receptores y correceptores de VIH

25 Los individuos que están expuestos al virus VIH pero permanecen sin infectar (expuestos a VIH no infectados, EU) y los pacientes sin progresión a largo plazo expresan cantidades significativamente mayores de defensinas, tales como α -defensinas, que los que evolucionan a SIDA. Véase, Rodríguez-García, 2010, anteriormente. Este factor se ha usado para determinar el estado de infección por VIH ensayando los niveles de varios polipéptidos de α -defensina (por ejemplo, ELISA, SELDI) en el cuerpo. Sin embargo, estos métodos son inexactos, requieren tiempo y utilizan reactivos caros tales como anticuerpos.

30 Según esto, hay una necesidad en la técnica para métodos alternativos para la identificación de pacientes que son resistentes a infección por VIH que superen las deficiencias de los métodos conocidos en el estado de la técnica.

35 **Breve compendio de la invención**

40 La presente invención muestra que el número de copias del gen *DEFA1A3* es mayor en individuos expuestos a VIH que permanecen sin infectar o que se convierten en pacientes sin progresión a largo plazo en comparación con sujetos que desarrollan la enfermedad.

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la probabilidad de que un sujeto se infecte por VIH o se convierta en paciente sin progresión a largo plazo tras la exposición al VIH que comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de dicho sujeto; en donde un número de copias de *DEFA1A3* aumentado con respecto a un valor de referencia es indicativo de una probabilidad aumentada de que el sujeto no se infecte o se convierta en un paciente sin progresión a largo plazo si se infecta; o en donde un número de copias de *DEFA1A3* disminuido con respecto a un valor de referencia es indicativo de una probabilidad aumentada de que el sujeto se infecte o se convierta en un paciente crónico con progresión.

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* de seleccionar una terapia para una infección por VIH o para una enfermedad asociada con una infección por VIH para un sujeto que comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de dicho sujeto en donde si el sujeto muestra un número de copias de *DEFA1A3* disminuido con respecto a una muestra de referencia se selecciona una terapia del grupo que consiste en terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión, inhibidores de integrasa, inhibidores de transcriptasa inversa y terapia de vacuna con un inmunógeno de VIH.

60 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende reactivos adecuados para detectar una variación en el número de copias de *DEFA1A3*.

65 En un último aspecto, la invención se refiere al uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión, inhibidores de integrasa, inhibidores de transcriptasa inversa y terapia de vacuna para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de SIDA o de una enfermedad asociada con la infección por VIH en un sujeto que ha

estado expuesto a VIH, en donde dicho sujeto muestra un número de copias de DEFA1A3 disminuido con respecto a un valor de referencia.

Diagramas

5 **Figura 1.** CDi de individuos EU que muestran una secreción aumentada de HNP 1-3. Los individuos EU indujeron una producción 2 veces significativamente mayor de HNP 1-3 comparados con los sanos ($p < 0,01$). Los pacientes de VIH indujeron una producción 1,5 veces mayor de HNP 1-3 comparados con los individuos sanos.

10 **Figura 2. A.** Los individuos EU poseen una VNC de *DEFA1A3* significativamente mayor. **B.** Los individuos EU poseen una VNC de *DEFA1A3* significativamente mayor comparados tanto con individuos sanos como con pacientes de VIH ($p < 0,05$).

15 **Figura 3.** Tinción intracelular en CDi de HNP 1-3 de un individuo EU con 10 VNC. Las CDi de un individuo EU de 10 VNC produjo la mayor cantidad de HNP 1-3. **A.** Citometría de flujo. **B.** inmunofluorescencia. Las proteínas HNP 1-3 se localizan en el citoplasma y se acumulan en gránulos cerca del núcleo.

20 **Figura 4.** La secreción de HNP 1-3 y citoquinas se asocia con una VNC de *DEFA1A3* alta en individuos sanos.

Figura 5. La VNC de *DEFA1A3* alta se correlaciona positivamente con HNP 1-3 secretadas por CDi. Se encontró una correlación significativa entre la VNC de *DEFA1A3* y HNP 1-3 secretadas por CDi en individuos sanos (Pearson $p < 0,05$).

25 **Figura 6.** CDi pulsadas con VIH cocultivadas con linfocitos autólogos de individuos sanos con una VNC de *DEFA1A3* elevada. Los ensayos de transinfección funcional usando CD infectadas con VIH mostraron una protección a VIH 5 veces mayor en individuos con VNC alta comparados con individuos con VNC baja.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención muestra que la VNC de *DEFA1A3* en individuos expuestos a VIH que permanecen sin infectar es mayor que en sujetos sanos. Además, la infección de PBMC con células dendríticas infectadas con VIH se produce a una eficacia mucho menor en células aisladas de pacientes que tienen un número de copias aumentado del gen *DEFA1A3*. Por tanto, la invención resuelve una necesidad de hace mucho tiempo en la técnica proporcionando composiciones y un método para determinar la probabilidad de contraer una infección por VIH basándose en la determinación del número de copias del gen *DEFA1A3* en el locus de la VNC de *DEFA1A3*. Este método es más preciso, rápido y fácil de llevar a cabo que otros métodos comparables. El método también podría ser útil para diseñar y seguir el tratamiento de SIDA y enfermedades asociadas con la infección por VIH, tal como TAR, TARGA y vacunas de células dendríticas.

1. Definiciones

45 El término “ α -defensina”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido cuya actividad biológica se caracteriza por tener actividad anti-VIH. Las α -defensinas generalmente tienen menos de 100 aminoácidos de longitud, habitualmente aproximadamente 25-35 aminoácidos de longitud, caracterizadas por seis residuos de cisteína en un motivo que está conservado entre especies. Véase, Liu L, *et al.*, Genomics 1997; 43:316-320 y Lehrer R, *et al.*, documento US 4.705.777. Las α -defensinas también tienen una carga positiva neta a pH fisiológico, generalmente atribuible a argininas cargadas positivamente. Se han encontrado α -defensinas en neutrófilos humanos, de conejo, cobaya, rata, macaco y hámster, en macrófagos alveolares de conejo, y en células de Paneth del intestino delgado humano y de roedores. Véase, Daher K, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA 1988, 85:7327-7331, Lehrer R, *et al.*, Infect. Immun. 1975; 11:1226-1234, Selsted M, *et al.*, Infect. Immun. 1984; 55:2181-2186, Eisenhauer P, *et al.*, Infect. Immun. 1989; 57:2021-2027, Tang Y, *et al.*, Infect. Immun. 1999; 67:6139-6144, Mak P, *et al.*, Infect. Immun. 1994; 64:4444-4449, Ganz T, *et al.*, J. Immunol. 1990; 143:1358-1365, Mallow E., *et al.*, J. Biol. Chem. 1996; 271:4038-4045, Ouellette A, *et al.*, J. Cell. Biol. 1989; 108:1687-1695, y Qu X, *et al.*, Infect. Immun. 1996; 64:5161-5165.

50 El término “SIDA”, como se usa en el presente documento, se refiere a la fase sintomática de la infección por VIH, e incluye tanto el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (comúnmente conocido como SIDA), como “CRS”, o complejo relacionado con el SIDA. Véase, Adler M, *et al.*, Brit. Med. J. 1987; 294: 1145-1147. Las manifestaciones inmunológicas y clínicas del SIDA se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, infecciones oportunistas y cánceres resultantes de la inmunodeficiencia.

65 El término “terapia antirretroviral” o “TAR”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de uno o más fármacos antirretrovirales para inhibir la replicación del VIH. Típicamente, la TAR implica la administración de al menos un agente antirretroviral (o, comúnmente, una mezcla de antirretrovirales) tales como inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico (por ejemplo, zidovudina (AZT), lamivudina (3TC) y abacavir),

inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico (por ejemplo, nevirapina y efavirenz) e inhibidor de proteasa (por ejemplo, indinavir, ritonavir y lopinavir). El término terapia antirretroviral de gran actividad (“TARGA”) se refiere a pautas de tratamiento diseñadas para suprimir enérgicamente la replicación vírica y evolución de la enfermedad de VIH, que consisten habitualmente en tres o más fármacos diferentes, tal como, por ejemplo, dos inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos y un inhibidor de proteasa.

El término “paciente crónico con progresión”, como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo que está infectado con VIH y que muestra un aumento en la carga vírica a lo largo del tiempo, después de la infección inicial.

El término “variación en el número de copias” o “VNC”, como se usa en el presente documento se refiere al número de copias de un gen particular en el genotipo de un individuo. Una VNC representa un cambio en el número de copias que implica un fragmento de ADN que tiene ~1 kilobase (kb) o más. Véase, Feuk L, *et al.*, Nature 2006; 444:444-454. Las VNC descritas en el presente documento no incluyen esas variantes que surgen de la inserción/delección de elementos transportables (por ejemplo, repeticiones -6-kb Kpn1) para minimizar la complejidad de futuros análisis de VNC. Por tanto, el término VNC abarca términos previamente introducidos tal como variantes de número de copias a gran escala (LCV), polimorfismos de número de copias (CNP), variantes de tamaño intermedio (ISV) y eDEL, pero no inserciones de retroposones. Véase, lafrate A, *et al.*, Nature Genetics 2004; 36:949-951, Sebat J, *et al.*, Science 2004; 305:525-528, y Tuzun A, *et al.*, Genome Res. 2006; 16: 949-961. Como se usa en el presente documento, un perfil de variación del número de copias (VNC) se refiere a información de las variaciones del número de copias de un conjunto de genes o loci genéticos en un sujeto, tal como un aumento en el número de copias (amplificación), un descenso en el número de copias (delección), o “sin cambio” en el número de copias de un gen o un locus genético. Preferiblemente, el conjunto de genes o loci genéticos comprende al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 25 genes o loci genéticos. El perfil se puede crear según un conjunto de medidas cuantitativas o cualitativas de las VNC de genes o regiones genómicas.

El término “número de copias de un gen”, como se usa en el presente documento, se refiere al número de secuencias de ADN en una célula que codifican un producto génico particular. Generalmente, para un gen determinado, un animal tiene dos copias de cada gen. El número de copias se puede aumentar, sin embargo, mediante amplificación o duplicación génica, o reducir mediante delección. El término “número de copias de genes” habitualmente se define como el número de genes por genoma.

El término “se correlaciona” o “correlacionar” como se usa en el presente documento, se refiere a una asociación estadística entre casos de dos hechos, donde los hechos pueden incluir números, conjuntos de datos, y similares. Por ejemplo, cuando los hechos implican números, una correlación positiva (también denominada en el presente documento “correlación directa”) significa que según aumenta uno, el otro también aumenta. Una correlación negativa (también denominada en el presente documento “correlación inversa”) significa que según aumenta uno, el otro disminuye. La presente invención proporciona VNC, cuyo nivel se correlaciona con una medida de desenlace particular, tal como entre un alto número de copias y la probabilidad de que un sujeto no se infecte tras la exposición a VIH o de convertirse en un paciente sin progresión a largo plazo si se infecta. Por ejemplo, el número de copias aumentado de una VNC puede estar correlacionado positivamente con una probabilidad de que un sujeto no se infecte o que se convierta en un paciente sin progresión a largo plazo si se infecta tras la exposición al VIH. Tal correlación positiva se puede demostrar estadísticamente de varias maneras, por ejemplo, mediante un cociente de riesgos bajo. En otro ejemplo, un número de copias aumentado en la VNC puede estar negativamente correlacionado con una probabilidad de que el sujeto se infecte o se convierta en un paciente con empeoramiento crónico. Tal correlación negativa indica que es probable que el paciente tenga un mal pronóstico, y esto se puede demostrar estadísticamente de varias maneras, por ejemplo, un cociente de riesgos alto.

El término “*DEFA1A3*”, como se usa en el presente documento, se refiere a una región genómica encontrada en la banda cromosómica 8p23.1 y que contiene las regiones codificantes de los péptidos de α -defensina HNP-1 (*DEFA1*) y HNP-3 (*DEFA3*). La nomenclatura previa en donde cada uno de los genes se consideraba individualmente se ha sustituido por el término “*DEFA1A3*”, ya que ambos genes forman parte de la misma VNC. Véase, Aldred P, *et al.*, Genomics 2005; 86:423-430. *DEFA1A3* también incluye moléculas monocatenarias y bicatenarias, así como ADN, ARN, ácidos nucleicos químicamente modificados y análogos de ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos o péptidos funcionalmente equivalentes. Se proporciona la secuencia del locus con número de copias variable de *DEFA1A3* en el registro de la base de datos del NCBI AF233439.7 (posiciones 217879 a 231282) (publicación del 16 de abril 2004) así como en el registro de la base de datos del NCBI AF238378.5 (posiciones 14936 a 42177, publicación del 17 de agosto de 2004).

El término “gen *DEFB1*”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína beta-defensina 1. Este gen también se conoce como BD1, HBD1 o DEFB-1. La secuencia de ARNm derivada del gen *DEFB1* humano se proporciona en el registro de la base de datos del NCBI NM_005218.3 (publicación del 16 de febrero de 2013) y que corresponde a la preproteína beta-defensina 1 en el registro de la base de datos del NCBI NP_005209.1 (publicación del 16 de febrero de 2013).

El término “célula dendrítica” (CD), como se usa en el presente documento, es una célula presentadora de antígeno que existe *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* o en un huésped o sujeto, o que puede derivar de una célula troncal hematopoyética o un monocito. Las células dendríticas y sus precursores se pueden aislar de una variedad de órganos linfoides (por ejemplo, bazo, ganglios linfáticos), así como de médula ósea y sangre periférica. La CD tiene una morfología característica con láminas finas (lamelipodia) que se extienden en múltiples direcciones separándose del cuerpo de la célula dendrítica. Típicamente, las células dendríticas expresan niveles altos de MHC y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD80 y CD86). Las células dendríticas pueden inducir la diferenciación de células T específica de antígeno *in vitro*, y son capaces de iniciar las respuestas de células T primarias *in vivo* e *in vitro*. El término “células dendríticas” incluye células dendríticas diferenciadas, sean células dendríticas inmaduras o maduras. Estas células se pueden caracterizar por la expresión de ciertos marcadores de superficie (por ejemplo, CD 11c, MHC de clase II, y al menos niveles bajos de CD80 y CD86). Además, las células dendríticas se pueden caracterizar funcionalmente por su capacidad para estimular alorespuestas y reacciones de linfocitos mezcla (MLR). La expresión “preparación de células dendríticas” se refiere a una composición que contiene células dendríticas obtenidas de un sujeto en un medio adecuado para pulsar dichas células.

La expresión “enfermedad asociada con una infección por VIH”, como se usa en el presente documento, incluye un estado en el que el sujeto ha desarrollado SIDA, así como un estado en el que el sujeto infectado con VIH no ha mostrado ningún signo o síntoma de la enfermedad. Por tanto, las composiciones de la invención cuando se administran a un sujeto que no tiene signos clínicos de la infección pueden tener actividad preventiva, ya que pueden prevenir el inicio de la enfermedad. Las composiciones son capaces de prevenir o retrasar la infección y destrucción de células T CD4+ sanas en tal sujeto. También se refiere a la prevención y retraso del inicio de los síntomas de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida tales como recuento de células T CD4+ extremadamente bajo e infecciones repetidas por patógenos oportunistas tales como *Mycobacteria spp.*, *Pneumocystis carinii*, y *Pneumocystis cryptococcus*. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, un aumento en el recuento de células T CD4+ indiferenciadas absoluto (intervalo 10-3520), un aumento en el porcentaje de células T CD4+ sobre las células inmunes circulantes totales (intervalo 1-50 por ciento) y/o aumento en el recuento de células T CD4+ como porcentaje del recuento de células T CD4+ normales en un sujeto sin infectar (intervalo 1-161 por ciento).

El término “TARGA”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier terapia antirretroviral de gran actividad y más recientemente se denomina terapia antirretroviral combinada o “TARc”, usado en el presente documento de forma intercambiable con “TARc”. TARGA y TARc también se usan en el presente documento de forma intercambiable. TARGA se puede referir a tres o más fármacos antirretrovirales en combinación, y habitualmente comprende un inhibidor de proteasas y dos o tres inhibidores de la transcriptasa inversa. Se pueden combinar diferentes clases de agentes antivirales para TARGA, por ejemplo, inhibidores de integrasa que incluyen inhibidores de la transferencia de hebra (INSTI) e inhibidores de la unión de integrasa (INBI); inhibidores de la ADN transcriptasa inversa que incluyen inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos y no nucleosídicos; inhibidores de proteasa; inhibidores de entrada; inhibidores de fusión; e inhibidores de la maduración del virus.

El término “VIH”, como se usa en el presente documento, incluye VIH-1, VIH-2 y VIS. “VIH-1” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. VIH-1 incluye pero no está limitado a partículas extracelulares de virus y formas de VIH-1 asociadas con células infectadas con VIH-1. El virus VIH-1 puede representar cualquiera de los subtipos principales conocidos (clases A, B, C, D, E, F, G y H) o el subtipo atípico (grupo O) incluyendo cepas de laboratorio y aislados primarios. “VIH-2” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2. VIH-2 incluye pero no está limitado a partículas extracelulares de virus y formas de VIH-2 asociadas con células infectadas con VIH-2. El término “VIS” se refiere al virus de la inmunodeficiencia simia que es un virus similar a VIH que infecta monos, chimpancés y otros primates no humanos. El VIS incluye pero no está limitado a, partículas víricas extracelulares y formas de VIS asociadas con células infectadas por VIS.

El término “agente anti-VIH”, “agente inhibidor de VIH” y “agente antiviral de VIH” como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos que pueda inhibir la replicación del VIH en una célula, tal como una célula en un mamífero o que es eficaz en el tratamiento, prevención o retraso del inicio o progresión de la infección por VIH o SIDA y/o enfermedades o afecciones que surgen de la misma o asociadas con la misma.

El término “individuo sin infectar expuesto al VIH” o “EU”, como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto expuesto al VIH y que no ha sido infectado con el virus. La presencia o ausencia de infección por VIH se puede mostrar demostrando la presencia de anticuerpos anti VIH, antígeno de VIH o ácido nucleico de VIH en el sujeto humano demostrado mediante la detección de la presencia de virus usando pruebas de VIH que conocen los expertos en la materia (por ejemplo, EIA de VIH, inmunotransferencia, pruebas de PCR).

El término “exposición a VIH”, como se usa en el presente documento, se refiere al contacto de un sujeto sin una infección por VIH o SIDA y un sujeto que tiene una infección por VIH o SIDA, o el contacto con líquidos

corporales de tal sujeto infectado con VIH, en el que tales líquidos del sujeto infectado se ponen en contacto con una membrana mucosa, un corte o una excoiación en el tejido (por ejemplo, pinchazo de aguja, relaciones sexuales sin protección) u otra superficie del sujeto sin infectar de tal modo que el virus se podría transmitir del sujeto infectado o líquidos corporales del sujeto infectado al sujeto sin infectar.

El término "inmunógeno de VIH", como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno proteico o peptídico derivado de VIH que es capaz de generar una respuesta inmune en un sujeto. Los ejemplos de inmunógenos de VIH incluyen, pero no están limitados a, proteínas gp160, gp120, gp41, Tat y Nef, y partes antigénicas de las mismas. Un inmunógeno puede ser una proteína de tipo salvaje o mutante aislada, o un antígeno proteico o peptídico recombinante o sintetizado o un derivado o variante de los mismos.

Como se usa en el presente documento, "infección por VIH" se refiere a indicaciones de la presencia del virus VIH en un individuo incluyendo seropositividad asintomática, complejo relacionado con SIDA (CRS) y síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA).

El término "α-defensina humana", como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos, variantes alélicas de las mismas y preproteínas de las mismas. Las secuencias para la α-defensina humana 1-6 son como sigue: α-defensina 1 (HNP-1): ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC (SEQ ID NO:1); α-defensina 2 (HNP-2): CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC (SEQ ID NO:2); α-defensina 3 (HNP-3): DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC (SEQ ID NO:3); α-defensina 4 (HNP-4): VCSCRLVFCRRETLRVGNCLIGGVSFTYCCTRV (SEQ ID NO:4); α-defensina 5 (HD-5): ARATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR (SEQ ID NO:5), y α-defensina 6 (HD-6): TRAFTHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCC (SEQ ID NO:6). Véase, Lehrer R, *et al.*, documento US 4.705.777. Los péptidos HNP-1 y HNP-3 maduros se diferencian solo en su aminoácido N-terminal debido a una única diferencia de nucleótido, C3400A, entre los genes DEFA1 y DEFA3.

El término "pacientes sin progresión a largo plazo", como se usa en el presente documento, se refiere a individuos que han estado infectados con el VIH durante aproximadamente 10 años o más, que se caracterizan por niveles normales y estables de células T CD4+, y que no han sido tratados con terapia antirretroviral.

El término "prevención", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de terapia, que se dirige a dificultar, impedir o evitar del todo una afección clínica como se describe en el presente documento. En una forma de realización preferida, el término prevención se refiere al tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la susceptibilidad a una afección clínica), de un trastorno o una afección como se define en el presente documento. El efecto profiláctico incluye prevenir que el trastorno se produzca o reaparezca en un sujeto.

El término "cebador" o "cebador oligonucleotídico", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que actúa para iniciar la síntesis de una hebra de ácido nucleico complementaria cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador, como por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente inductor de la polimerización tal como ADN o ARN polimerasa y una temperatura, pH, concentración de iones metálicos y concentración de sales adecuadas. Los cebadores generalmente tienen una longitud compatible con su uso en la síntesis de productos de extensión de cebadores, y pueden estar en el intervalo de entre aproximadamente 8 nucleótido y aproximadamente 100 nucleótidos (nt) de longitud, tal como de aproximadamente 10 nt hasta aproximadamente 75 nt, de aproximadamente 15 nt hasta aproximadamente 60 nt, de aproximadamente 15 nt hasta aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 18 nt hasta aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 20 nt hasta aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 21 nt hasta aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 22 nt hasta aproximadamente 45 nt, de aproximadamente 25 nt hasta aproximadamente 40 nt, y así sucesivamente, como por ejemplo, en el intervalo entre aproximadamente 18 nt y aproximadamente 40 nt, entre aproximadamente 20 nt y aproximadamente 35 nt, entre aproximadamente 21 nt y aproximadamente 30 nt de longitud, inclusive, y cualquier longitud entre los intervalos indicados. Los cebadores pueden estar en el intervalo de entre aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente 15-45, aproximadamente 18-40, aproximadamente 20-30, aproximadamente 21-25 nt y así sucesivamente, y cualquier longitud entre los intervalos indicados. En algunas formas de realización, los cebadores no tienen más de aproximadamente 10, 12, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 nucleótidos de longitud. En este contexto, el término "aproximadamente" se puede interpretar que significa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos más, bien en 5' o 3' desde cualquier extremo o desde ambos extremos.

Los cebadores son, en muchas formas de realización, monocatenarios para una eficacia máxima en la amplificación, pero pueden ser alternativamente bicatenarios. Si es bicatenario, el cebador en muchas formas de realización, primero se trata para separar sus hebras antes de usarlo para preparar productos de extensión. El paso de desnaturalización se puede llevar a cabo mediante calor, o alternativamente, usando una solución alcalina, seguido por neutralización. Por tanto, un "cebador" es complementario a un molde, y forma complejos mediante puentes de hidrógeno o hibridación con el molde para dar un complejo cebador/molde para el inicio de

la síntesis mediante una polimerasa, que se extiende mediante la adición covalente de bases en su extremo 3'. Un "par de cebadores" como se usa en el presente documento se refiere a un primer y segundo cebadores que tienen una secuencia de ácido nucleico adecuada para la amplificación basada en ácido nucleico de un ácido nucleico diana. Tales pares de cebadores generalmente incluyen un primer cebador que tiene una secuencia que es igual o similar al de una primera parte de un ácido nucleico diana, y un segundo cebador que tiene una secuencia que es complementaria a una segunda parte del ácido nucleico diana para proporcionar la amplificación del ácido nucleico diana o un fragmento del mismo. La referencia al "primer" y "segundo" cebador es en el presente documento arbitraria, a menos que específicamente se indique de otra manera. Por ejemplo, se puede diseñar el primer cebador como un "cebador directo" (que inicia la síntesis del ácido nucleico desde un extremo 5' del ácido nucleico diana) o como un "cebador inverso" (que inicia la síntesis del ácido nucleico desde el extremo 5' del producto de extensión producido de la síntesis iniciada desde el cebador directo). Asimismo, se puede diseñar el segundo cebador como un cebador directo o un cebador inverso.

El término "sonda", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, polinucleótido o ácido nucleico, bien ARN o ADN, sea natural como en un digerido de enzima de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de aparearse con o hibridar específicamente con un ácido nucleico con secuencias complementarias a las de la sonda. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. La longitud exacta de la sonda dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente de la sonda y uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, la sonda oligonucleotídica típicamente contiene aproximadamente 10-100, aproximadamente 10-50, aproximadamente 15-30, aproximadamente 15-25, aproximadamente 20-50, o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos. Las sondas en el presente documento se pueden seleccionar que sean complementarias a diferentes hebras de una secuencia de ácido nucleico diana particular. Esto significa que las sondas deben ser lo suficientemente complementarias para poder "hibridar específicamente" o aparearse con sus respectivas hebras diana en un conjunto de condiciones predeterminadas. Por tanto, la secuencia de la sonda no necesita reflejar la secuencia complementaria exacta de la diana, aunque puede. Por ejemplo, un fragmento de nucleótidos no complementarios puede estar unido al extremo 5' o 3' de la sonda, siendo el resto de la secuencia de la sonda complementario a la hebra diana. De forma alternativa, se pueden entremezclar bases o secuencias más largas no complementarias en la sonda, siempre que la secuencia de la sonda tenga la suficiente complementariedad con la secuencia del ácido nucleico diana para aparearse específicamente con el mismo.

Las sondas generalmente tienen una longitud compatible con su uso en la detección específica de toda o una parte de la secuencia diana de un ácido nucleico diana, y están, en muchas formas de realización, en el intervalo de entre aproximadamente 8 nt y aproximadamente 100 nt de longitud, tal como de aproximadamente 8 nt hasta aproximadamente 75 nt, de aproximadamente 10 nt hasta aproximadamente 74 nt, de aproximadamente 12 nt hasta aproximadamente 72 nt, de aproximadamente 15 nt hasta aproximadamente 60 nt, de aproximadamente 15 nt hasta aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 18 nt hasta aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 20 nt hasta aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 21 nt hasta aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 22 nt hasta aproximadamente 45 nt, de aproximadamente 25 nt hasta aproximadamente 40 nt de longitud, y así sucesivamente, como por ejemplo, en el intervalo de entre aproximadamente 18-40 nt, aproximadamente 20-35 nt o aproximadamente 21-30 nt de longitud y cualquier longitud entre los intervalos indicados. En algunas formas de realización, una sonda está en el intervalo de entre aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente 15-45, aproximadamente 18-40, aproximadamente 20-30, aproximadamente 21-28 nt, aproximadamente 22-25 nt, y así sucesivamente, y cualquier longitud entre los intervalos indicados. En algunas formas de realización, las sondas no tienen más de aproximadamente 10, 12, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 nucleótidos de longitud. En este contexto, el término "aproximadamente" se puede interpretar que significa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos más, bien en 5' o 3' desde cualquier extremo o desde ambos extremos.

El término "inhibidor de proteasa", como se usa en el presente documento, se refiere a inhibidores de la proteasa de VIH-1, una enzima requerida para la degradación proteolítica de los precursores poliproteicos víricos (por ejemplo, poliproteínas GAG y GAG Pol víricas), en las proteínas funcionales individuales encontradas en VIH-1 infeccioso.

El término "valor de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a número de copias del gen *DEFA1A3* en una muestra de referencia. De forma alternativa, el término "valor de referencia" se puede usar para definir el número de copias de un gen que aparece una vez por genoma haploide.

El término "muestra de referencia", como se usa en el presente documento, significa una muestra obtenida de sujetos, preferiblemente dos o más sujetos, que se sabe que no tienen la enfermedad o, alternativamente, de la población general. El número de copias adecuado del gen *DEFA1A3* se puede determinar midiendo el número de copias del gen *DEFA1A3* en varios sujetos adecuados, y tales niveles de referencia se pueden ajustar a poblaciones sujeto específicas. En una forma de realización preferida, la muestra de referencia se obtiene de un sujeto no infectado con VIH.

El término “inhibidores de la transcriptasa inversa”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que inhibe la actividad de la transcriptasa inversa de VIH-1, la enzima que cataliza la conversión del ARN genómico vírico de VIH-1 en ADN provírico de VIH-1.

5 El término “gen *RNasa P*”, como se usa en el presente documento, se refiere a un gen que codifica la ribozima ribonucleasa P (*RNasa P*). Los complejos catalíticos de las ribonucleoproteínas de ribonucleasa P nuclear están compuestos de varias subunidades de proteínas que parecen tener papeles específicos en la función enzimática en el procesamiento de ARNt. En el caso de la *RNasa P* humana, se han descrito las subunidades Rpp14 (subunidad MRP de 14 kDa), Rpp20 (subunidad MRP de 20 kDa), Rpp21 (subunidad MRP de 21 kDa), Rpp25 (subunidad MRP de 25 kDa), Rpp29, Rpp30 (subunidad MRP de 30 kDa), Rpp38 (subunidad MRP de 38 kDa), Rpp40 (subunidad MRP de 40 kDa), hPOP1, hPOP5 y ARN H1 (Jarrous N 2002 RNA 8: 1-7). Las secuencias de ARNm para las subunidades de la *RNasa P* humana se proporcionan en los registros de la base de datos del NCBI NM_001098783.2 (variante 1 de la subunidad p14), NM_007042.4 (variante 2 de la subunidad p14), NM_017793.2 (subunidad p25), NM_001199120.1 (variante 1 de la subunidad p21), NM_024839.2 (variante 2 de la subunidad p21), NM_001199121.1 (variante 3 de la subunidad p21), NM_017793.2 (subunidad p25), NM_001104546.1 (variante 1 de la subunidad p30), NM_006413.4 (variante 2 de la subunidad p30), NM_183005.4 (variante 1 de la subunidad p38), NM_006414.4 (variante 2 de la subunidad p38), NM_001097590.2 (variante 3 de la subunidad p38), NM_001265601.1 (variante 4 de la subunidad p38), NM_006638.2 (subunidad p40). Las secuencias de proteínas para las subunidades de la *RNasa P* humana se proporcionan en los registros de la base de datos NP_001092253.1 (variante 1 de la subunidad p14), NP_008973.1 (variante 2 de la subunidad p14), NP_060263.2 (subunidad p25), NP_001186049.1 (variante 1 de la subunidad p21), NP_079115.1 (variante 2 de la subunidad p21), NP_001186050.1, (variante 3 de la subunidad p21), NP_060263.2 (subunidad p25), NP_001098016.1 (variante 1 de la subunidad p30), NP_006404.1 (variante 2 de la subunidad p30), NP_892117.1 (variante 1 de la subunidad p38), NP_006405.2 (variante 2 de la subunidad p38), NP_001091059.1 (variante 3 de la subunidad p38), NP_001091059.1 (variante 4 de la subunidad p38), NP_006629.2 (subunidad p40).

El término “muestra”, como se usa en el presente documento, se refiere a una pequeña parte de un sujeto, representativa del todo y puede estar constituida por una biopsia o una muestra de un líquido corporal. Las biopsias son pequeños trozos de tejido y pueden ser recientes, congeladas o fijadas, tal como fijada en formalina y embebida en parafina (FEPE). Las muestras se puede retirar quirúrgicamente, mediante extracción (es decir, mediante aguja hipodérmica o de otros tipos), microdissección o captura laser.

El término “hibridación específicamente”, como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones que permiten la hibridación de dos polinucleótidos en condiciones muy rigurosas o condiciones moderadamente rigurosas. La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable para el experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para la hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado de volver a hibridar cuando están presentes hebras complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, resulta que las temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas más bajas, no tanto. Véase, Brown T, “Gene Cloning” (Chapman & Hall, London, UK, 1995); Watson R, *et al.*, “Recombinant DNA”, 2ª Ed. (Scientific American Books, Nueva York, NY, EE UU, 1992); Alberts B, *et al.*, “Molecular Biology of the Cell” (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, EE UU, 2008); Innis M, *et al.*, Eds., “PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications” (Academic Press Inc., San Diego, CA, EE UU, 1990); Erlich H, Ed., “PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification” (Stockton Press, Nueva York, NY, EE UU, 1989); Sambrook J, *et al.*, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE UU, 1989); Bishop T, *et al.*, “Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach” (IRL Press, Oxford, UK, 1987); Reznikoff W, Ed., “Maximizing Gene Expression” (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, EE UU, 1987); Davis L, *et al.*, “Basic Methods in Molecular Biology” (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, NY, EE UU, 1986), Schleaf M, Ed., “Plasmid for Therapy and Vaccination” (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001).

Las “condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se usa en el presente documento, se refiere a: (1) el uso de soluciones de baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, tal como por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) el uso, durante la hibridación, de un agente desnaturalizante, tal como formamida, en una solución de formamida al 50% (v/v) con seroalbúmina bovina al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) el uso de una solución de formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en SSC 0,2x (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50%, seguido por un lavado de alta rigurosidad consistente en SSC 0,1x que contiene EDTA a 55°C. El término “condiciones moderadamente rigurosas”, como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de hibridación

conocidas en la técnica, y pueden incluir el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Véase, Sambrook, 1989, anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es una incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido por el lavado de los filtros en SSC 1x a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, y otros parámetros, según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y abundancia relativa de nucleótidos.

El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo, planta o animal, tal como un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otras especies de simios y monos); animales de granja, tales como aves, peces, ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como perros y gatos; animales de laboratorio, incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas. El término no indica una edad o sexo particulares. El término “sujeto” abarca un embrión y un feto.

El término “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de terapia, cuyo fin es terminar, mejorar o reducir la susceptibilidad a una afección clínica como se describe en el presente documento. En una forma de realización preferida, el término tratamiento y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto farmacológico o fisiológico deseado, que cubre cualquier tratamiento de una afección o trastorno patológicos en un mamífero, incluyendo un ser humano. El efecto preventivo incluye (1) inhibición del trastorno, tal como detención de su desarrollo, (2) parar o terminar el trastorno o al menos los síntomas asociados al mismo, de modo que el huésped no padezca más el trastorno o sus síntomas, tal como producir la regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, restableciendo o reparando una función perdida, que falta o defectuosa, o estimulando un proceso ineficaz, o (3) mitigar, aliviar o mejorar el trastorno, o los síntomas asociados con el mismo, donde mejorar se usa en sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor o deficiencia inmune.

El término “inhibidor de la entrada de virus”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto capaz de interferir con la entrada de virus en las células.

2. Método para predecir la probabilidad de que un sujeto se infecte por VIH tras la exposición a VIH

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la probabilidad de que un sujeto sea infectado por VIH o de convertirse en un paciente sin progresión a largo plazo tras la exposición a VIH que comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de dicho sujeto;

en donde un número de copias de *DEFA1A3* aumentado con respecto a un valor de referencia es indicativo de una probabilidad disminuida de que el sujeto se infecte o de una probabilidad aumentada de que el sujeto se convierta en un paciente sin progresión a largo plazo;

o,

en donde un número de copias de *DEFA1A3* disminuido con respecto a un valor de referencia es indicativo de una probabilidad aumentada de que el sujeto se infecte.

En un primer paso, el método de la invención comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de dicho sujeto.

Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano, conejo, cobaya, rata, macaco o hámster. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Los métodos adecuados para detectar variaciones en el número de copias en loci genéticos, genes o exones en ADN_g incluyen, pero no están limitados a, genotipado por oligonucleótidos, secuenciación, transferencia tipo Southern, hibridación genómica comparativa basada en matrices, hibridación dinámica específica de alelos (DASH), prueba de relación de parálogos (PRT), cuantificación de amplicones múltiple (MAQ), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR), amplificación de sonda dependiente de ligación multiplex (MLPA), amplificación multiplex e hibridación de sonda (MAPH), PCR multiplex cuantitativa de fragmentos fluorescentes cortos (QMPSF), hibridación dinámica específica de alelos, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) e hibridación fluorescente *in situ* semicuantitativa (SQ-FISH). Véase, Kallioniemi, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89:5321-5325, Sambrook, 1989, e Innis, 1990, anteriormente.

En una forma de realización preferida, las variaciones en el número de copias se evalúan mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Véase, Logan J, *et al.*, Eds., Real-time PCR: current technology and applications (Caister Academic Press, Ltd., Norfolk, UK, 2009). Brevemente, se usa qPCR para la amplificación y cuantificación simultánea de una única o múltiples secuencias diana en una muestra. Por ejemplo, la PCR cuantitativa en tiempo real detecta aumentos en la fluorescencia en cada ciclo de PCR mediante (por ejemplo, sondas que hibridan con una parte de una o más sondas de amplificación) la liberación de fluorescencia de una secuencia extintora mientras que el unicebador (cebador universal) se une a la secuencia

de ADN. La fluorescencia en la PCR cuantitativa en tiempo real se produce usando un colorante indicador fluorescente adecuado tal como verde SYBR, FAM, fluoresceína, HEX, TET o TAMRA, y un extintor tal como DABSYL o Black Hole. Cuando el extintor se separa de la sonda durante la fase de extensión de la PCR, la fluorescencia del indicador se puede medir. Se pueden usar sistemas como balizas moleculares, sondas Taqman, cebadores scorpion o cebadores sunrise para realizar la PCR cuantitativa en tiempo real. Véase, Tyagi S, *et al.*, documentos US 5.925.517, US 6.103.476, US 6.150.097, y US 6.037.130.

En una forma de realización preferida, los cebadores usados en la RT-PCR son capaces de hibridar específicamente con la región *DEFA1A3*. En una forma de realización más preferida, los cebadores comprenden las secuencias de SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. En una forma de realización aún más preferida, la detección de los amplicones se lleva a cabo usando una sonda de detección que comprende la secuencia de SEQ ID NO:9. La sonda de detección está preferiblemente marcada con FAM.

En una forma de realización más preferida, los cebadores usados en la RT-PCR comprenden las secuencias de SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17. En una forma de realización aún más preferida, la detección de los amplicones se lleva a cabo usando una sonda de detección que comprende la secuencia de SEQ ID NO:18. La sonda de detección preferiblemente se marca con FAM.

En otra forma de realización, la variación en el número de copias de *DEFA1A3* se determina como una variación en el número de copias en el alelo *DEFA1*, en el alelo *DEFA3* o en ambos alelos. En una forma de realización preferida, la determinación de número de copias en los alelos *DEFA1* y/o *DEFA3* se lleva a cabo mediante pirosecuenciación. En una forma de realización aún más preferida, los cebadores de amplificación por PCR usados en la pirosecuenciación comprenden las secuencias SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14. En aún otra forma de realización, el cebador de secuenciación usado en la reacción de pirosecuenciación comprende la secuencia de SEQ ID NO:15.

En una forma de realización preferida, la muestra biológica se selecciona del grupo de una biopsia o una muestra de líquido corporal. Las muestras de líquido corporal pueden ser muestras de sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, leche o líquido ductal y puede ser asimismo reciente, congelada o fijada. Preferiblemente, las muestras contienen material biológico adecuado para detectar el biomarcador adecuado (ADN), por tanto, dicha muestra debe comprender, ventajosamente, material celular. Los ejemplos de la muestra biológica incluyen sangre completa, PBMC y células T. Los métodos para recoger y preparar estas muestras biológicas se conocen en la técnica. En una forma de realización particular, la muestra es una muestra de líquido corporal tal como una muestra de sangre; preferiblemente, la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del sujeto.

Una vez se ha determinado el número de copias del gen *DEFA1A3*, la invención permite la determinación de la probabilidad de que un sujeto se infecte por VIH o se convierta en un paciente sin progresión a largo plazo tras la exposición a VIH en donde un número aumentado de copias de *DEFA1A3* con respecto a un valor de referencia es indicativo de una probabilidad disminuida de que se infecte o de una probabilidad aumentada de que se convierta en un paciente sin progresión a largo plazo o en donde un número disminuido de copias con respecto a valor de referencia es indicativo de una probabilidad aumentada de que un sujeto se infecte o sea paciente crónico con progresión.

Como se usa en el presente documento, "aumentado", se refiere al número de copias de *DEFA1A3* que es al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 mayor que el valor de referencia.

Como se usa en el presente documento, "disminuido", se refiere al número de copias de *DEFA1A3* que es al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 menor que el valor de referencia.

En un aspecto, 5 o más copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que el sujeto no se infecte o, si se infecta, de que el paciente se convierta en un sujeto paciente sin progresión a largo plazo. En un aspecto, menos de 5 copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que un paciente se infecte o se convierta en un paciente crónico con progresión.

En un aspecto, 9 o más copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que el sujeto no se infecte o, si se infecta, de que el paciente se convierta en un sujeto paciente sin progresión a largo plazo. En un aspecto, menos de 9 copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que un paciente se infecte o se convierta en un paciente crónico con progresión.

En un aspecto adicional, sujetos con 4 o menos copias del gen son pacientes con progresión de VIH.

Se entenderá que el número de copias del gen *DEFA1A3* se refiere al número de copias por genoma completo, es decir, considerando las copias encontradas en los dos cromosomas.

5 En una forma de realización particular, la referencia para evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* se selecciona del gen *DEFB1* o del gen *RNasa-P*.

10 En los métodos descritos en el presente documento, se proporciona un riesgo individual para que un paciente expuesto al VIH se infecte o se convierta en paciente sin progresión a largo plazo. En ciertas formas de realización, la significación asociada con la probabilidad de una variación en el número de copias se mide mediante un riesgo relativo (RR). En otra forma de realización, la significación asociada con la probabilidad de una variación en el número de copias se mide mediante un cociente de posibilidades (OR). En una forma de realización adicional, la significación se mide mediante un porcentaje. En una forma de realización, una probabilidad aumentada significativa se mide como un riesgo (riesgo relativo y/o cociente de posibilidades) de al menos 1,2, incluyendo, pero no limitado a: al menos 1,5, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2,0, al menos 2,5, al menos 3,0, al menos 4,0, al menos 5,0, al menos 6,0, al menos 7,0, al menos 8,0, al menos 9,0, al menos 10,0 y al menos 15,0. En una forma de realización particular, un riesgo (riesgo relativo y/o cociente de posibilidades) de al menos 2,0 es significativo. En otra forma de realización particular, un riesgo de al menos 3,0 es significativo. En aún otra forma de realización, un riesgo de al menos 4,0 es significativo. En una forma de realización adicional, un riesgo de al menos 5,0 es significativo. En otra forma de realización adicional, un riesgo de al menos 10,0 es significativo. Sin embargo, también se contemplan otros valores para riesgo significativo, por ejemplo, al menos 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, o cualquier otro valor numérico adecuado, y tales valores también están dentro del ámbito de la presente invención. En otras formas de realización, un aumento significativo en la probabilidad es al menos aproximadamente del 20%, incluyendo pero no limitado a aproximadamente el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, y 1500%. En una forma de realización particular, un aumento significativo en la probabilidad es al menos del 100%. En otras formas de realización, un aumento significativo en la probabilidad es al menos el 200%, al menos el 300%, al menos el 400%, al menos el 500%, al menos el 700%, al menos el 800%, al menos el 900% y al menos el 1000%. Sin embargo, también se contemplan otros valores de corte o intervalos juzgados adecuados por el experto en la materia para caracterizar la invención, y esos también están dentro del ámbito de la presente invención. En ciertas formas de realización, un aumento significativo en el riesgo se caracteriza por un valor de p, tal como un valor de p de menos de 0,05, menos de 0,01, menos de 0,001, menos de 0,0001, menos de 0,00001, menos de 0,000001, menos de 0,0000001, o menos de 0,00000001.

35 Sin embargo, también se contemplan otros valores de corte o intervalos juzgados adecuados por el experto en la materia para caracterizar la invención, y esos también están dentro del ámbito de la presente invención.

40 3. Método para seleccionar una terapia anti-VIH para un sujeto

El método de la invención puede ayudar en la puesta a punto fina de las pautas de tratamiento de pacientes de VIH, con tratamiento anti-VIH menos agresivo diseñado para pacientes sin progresión y pautas más agresivas, tal como TAR o TARGA, recetadas a los pacientes con progresión. El método de la invención puede ser útil para personalizar el tratamiento de VIH y por tanto, reducir o minimizar sus efectos secundarios indeseables (por ejemplo, cáncer, dolor neuropático, nefropatía, osteoporosis) al tiempo que se conservan sus beneficios terapéuticos.

50 Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* de seleccionar una terapia para una infección por VIH o de una enfermedad asociada con una infección de VIH para un sujeto que comprende evaluar la variación del número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de dicho sujeto en donde si el sujeto muestra número de copias de *DEFA1A3* disminuido con respecto a una muestra de referencia se selecciona una terapia anti-VIH.

55 En una forma de realización preferida, la terapia anti-VIH se selecciona del grupo que consiste en terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), inhibidores de proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de entrada, inhibidores de integrasa, agentes específicos para correceptores y terapia de vacuna usando un inmunógeno de VIH.

60 Los inhibidores de la proteasa adecuados que se pueden combinar con los miARN o polinucleótidos que codifican miARN según la invención se seleccionan del grupo que consiste en ritonavir, lopinavir, saquinavir, amprenavir, fosamprenavir, nelfmavir, tipranavir, indinavir, atazanavir, TMC-126, darunavir, mozenavir (DMP-450), JE-2147 (AG1776), L-756423, KNI-272, DPC-681, DPC-684, telinavir (SC-52151), BMS 186318, droxinavir (SC-55389a), DMP-323, KNI-227, 1-[(2-hidroxi)etil]-6-(feniltio)-timina, AG-1859, RO-033-4649, R-944, DMP-850, DMP-851, y brecanavir (GW640385). Los inhibidores de la proteasa preferidos para su uso en combinación con un compuesto de la presente invención incluyen saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfmavir,

amprenavir, lopinavir, atazanavir, darunavir, brecanavir, fosamprenavir, y tipranavir. Tales combinaciones particularmente útiles incluyen, por ejemplo, AZT+3TC; TDF+3TC; TDF+FTC; ABC+3TC y abacavir+3TC.

Los inhibidores de la transcriptasa inversa adecuados para su uso en las composiciones según la presente invención es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en emtricitabina, capravirina, tenofovir, lamivudina, zalcitabina, delavirdina, nevirapina, didanosina, estavudina, abacavir, alovudina, zidovudina, emtricitabina racémica, apricitabina, emivirina, elvicitabina, TMC-278, DPC-083, amdoxovir, (-)-beta-D-2,6-diamino-purina dioxolano, MIV-210 (FLG), DFC (dexelvicitabina), dioxolano timidina, Calanolida A, etravirina (TMC-125), L697639, atevirdina (U87201E), MIV-150, GSK-695634, GSK-678248, TMC-278, KP1461, KP-1212, Iodenasina (FddA), ácido 5-[(3,5-diclorofenil)tio]-4-isopropil-1-(4-piridilmetil)imidazol-2-metanol carbámico, (-)-l²-D-2,6-diaminopurina dioxolano, AVX-754, BCH-13520, BMS-56190 ((4S)-6-cloro-4-[(1E)-ciclopropiletenil]-3,4-dihidro-4-trifluorometil-2-(1H)-quinazolinona), TMC-120, y L697639, donde los compuestos están presentes en cantidades eficaces para el tratamiento de VIH cuando se usan en una terapia de combinación.

Los inhibidores de entrada de virus adecuados incluyen inhibidor de fusión, un inhibidor de la unión al receptor CD4, es un mimético de CD4 o un mimético de gp120. En algunas formas de realización adicionales, el inhibidor de entrada de virus es un antagonista de gp41, un anticuerpo monoclonal de CD4 o un antagonista de CCR5, incluyendo subclases de antagonistas de CCR5 tales como, por ejemplo, inhibidores con dedo de zinc. En aún otra forma de realización, el inhibidor de entrada del virus es un antagonista del correceptor CXCR4.

Los inhibidores de entrada adecuados (incluyendo inhibidores fusión) incluyen, pero no están limitados a raltegravir (Isentress™, MK-0518, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EE UU) elvitegravir (GS 9137, Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, EE UU), enfuvirtida (Fuzeon(R)™, AnorMED, Inc., Langley, BC, CA), T1249 (Trimeris Inc., Durham, NC, EE UU), PRO-542 (Progenics Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY, EE UU), BMS 806 (Bristol Myers Squibb Co., Nueva York, NY, EE UU), AMD070 (AnorMED, Inc., Langley, BC, CA), y SCH C (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EE UU), un antagonista de CCR5 que bloquea la interacción entre el bucle V3 de gp120 y el receptor CCR5. Hay otros inhibidores de la integrasa de VIH adecuados que se divulgan en la técnica. Véase, Silverman K, *et al.*, documento US 6.124.327 y Dombrowski A, *et al.*, documento US 6.245.806.

Los inmunógenos de VIH para su uso según la presente invención se pueden seleccionar de cualquier aislado de VIH (por ejemplo, cualquier aislado, cepa o clado de VIH-1, VIH-2 o VIH-3 primario o cultivado). Como se sabe bien en la técnica, los aislados de VIH se clasifican ahora en subtipos genéticos discretos. Se sabe que VIH-1 comprende al menos diez subtipos (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, PL, F2, G, H, J y K). Véase, Taylor M, *et al.*, N. Engl. J. Med. 2008; 359(18):1965-1966. Se sabe que VIH-2 incluye al menos cinco subtipos (A, B, C, D y E). El subtipo B se ha asociado con la epidemia de VIH en hombres homosexuales y drogadictos por vía intravenosa en el mundo. La mayoría de los inmunógenos de VIH-1, aislados adaptados a laboratorio, reactivos y epítomos mapeados pertenecen al subtipo B. En África subsahariana, India y China, áreas donde la incidencia de nuevas infecciones por VIH es alta, el subtipo B de VIH-1 responde solo por una pequeña minoría de infecciones, y el subtipo C de VIH-1 parece ser el subtipo infectivo más común. Por tanto, en ciertas formas de realización, puede ser preferible seleccionar inmunógenos de subtipos particulares (por ejemplo, subtipos B o C de VIH-1). Puede ser deseable incluir inmunógenos de múltiples subtipos de VIH (por ejemplo, subtipos B y C de VIH-1 y subtipos A y B de VIH-2, o una combinación de subtipos de VIH-1, VIH-2 o VIH-3) en una única composición inmunológica.

Los inmunógenos de VIH adecuados incluyen la envuelta (env; por ejemplo, Seq. Ref. de NCBI NPJ357856), gag (por ejemplo, p6, p7, p17, p24, GenBank AAD39400J), la proteasa codificada por pol (por ejemplo, UniProt P03366), nef (por ejemplo, GenBank CAA4I585J, Shugars D, *et al.*, J. Virol. 1993; 8:4639-4650) de VIH, así como variantes, derivados y proteínas de fusión de las mismas como se ha descrito en la técnica. Véase, Gómez S, *et al.*, Vaccine 2007; (25):169-192. El experto en la materia puede seleccionar cepas y combinaciones adecuadas según desee.

El método para seleccionar una terapia según la invención comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de un sujeto.

Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano, conejo, cobaya, rata, macaco o hámster. Más preferiblemente, el sujeto es humano.

En una forma de realización preferida, las variaciones en el número de copias se evalúan mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR). Véase, Logan J, *et al.*, Eds., Real-time PCR: current technology and applications (Caister Academic Press, Ltd., Norfolk, UK, 2009).

En una forma de realización preferida, los cebadores usados en la RT-PCR comprenden las secuencias de SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. En una forma de realización aún más preferida, la detección de los amplicones se lleva

a cabo usando una sonda de detección que comprende la secuencia de SEQ ID NO:9. La sonda de detección preferiblemente se marca con FAM.

5 En una forma de realización preferida, los cebadores usados en la RT-PCR comprenden las secuencias de SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17. En una forma de realización aún más preferida, la detección de los amplicones se lleva a cabo usando una sonda de detección que comprende la secuencia de SEQ ID NO:18. La sonda de detección preferiblemente se marca con FAM.

10 En otra forma de realización, la variación en el número de copias de *DEFA1A3*, se determina como una variación en el número de copias en el alelo *DEFA1*, en el alelo *DEFA3* o en ambos alelos. En una forma de realización preferida, la determinación de número de copias en los alelos *DEFA1* y/o *DEFA3* se lleva a cabo mediante pirosecuenciación. En una forma de realización aún más preferida, los cebadores de amplificación por PCR usados en la pirosecuenciación comprenden las secuencias SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14. En aún el cebador de secuenciación usado en la reacción de pirosecuenciación comprende la secuencia de SEQ ID NO:15.

15 En una forma de realización preferida, la muestra biológica se selecciona del grupo de una biopsia o una muestra de líquido corporal. Las muestras de líquido corporal pueden ser muestras de sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, leche o líquido ductal y puede ser asimismo reciente, congelada o fijada. Preferiblemente, las muestras contienen material biológico adecuado para detectar el biomarcador adecuado (ADN), por tanto, dicha muestra debe comprender, ventajosamente, material celular. Los ejemplos de la muestra biológica incluyen sangre completa, PBMC y células T. Los métodos para recoger y preparar estas muestras biológicas se conocen en la técnica. En una forma de realización particular, la muestra es una muestra de líquido corporal tal como una muestra de sangre; preferiblemente, la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del sujeto.

20 Una vez se ha determinado el número de copias del gen *DEFA1A3*, la invención permite la selección de una terapia adecuada para el paciente en donde un número de copias disminuido de *DEFA1A3* con respecto a un valor de referencia es indicativo de que el sujeto se debe tratar con una terapia anti-VIH.

30 Como se usa en el presente documento, "disminuido", se refiere al número de copias de *DEFA1A3* que es al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 menor que el valor de referencia.

35 En una forma de realización particular, la referencia para evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* se selecciona del gen *DEFB1* o el gen *RNasa-P*.

40 En un aspecto, 5 o más copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que el sujeto no se infecte o, si se infecta, de que el paciente se convierta en un sujeto sin progresión a largo plazo. En un aspecto, menos de 5 copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que un paciente se infecte o se convierta en un paciente crónico con progresión.

45 En un aspecto, 9 o más copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que el sujeto no se infecte o, si se infecta, de que el paciente se convierta en un sujeto sin progresión a largo plazo. En un aspecto, menos de 9 copias del gen *DEFA1A3* son predictivas de que un paciente se infecte o se convierta en un paciente crónico con progresión.

En un aspecto adicional, sujetos con 4 o menos copias del gen son pacientes con progresión de VIH.

50 4. *Uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de SIDA o de una enfermedad asociada con infección por VIH*

55 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión, inhibidores de integrasa, inhibidores de transcriptasa inversa y terapia de vacuna para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de SIDA o de una enfermedad asociada con infección por VIH en un sujeto que se ha expuesto a VIH, en donde dicho sujeto muestra un número de copias de *DEFA1A3* disminuido con respecto a un valor de referencia. Alternativamente, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de SIDA o de una enfermedad asociada con la infección por VIH en un sujeto que ha estado expuesto a VIH que comprende la administración a dicho sujeto de una terapia seleccionada de terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión, inhibidores de integrasa, inhibidores de transcriptasa inversa y terapia de vacuna, en donde dicho sujeto muestra un número de copias disminuido de *DEFA1A3* con respecto a un valor de referencia.

Los inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión, inhibidores de integrasa, inhibidores de transcriptasa inversa e inmunógenos de VIH para terapia de vacuna adecuados se han descrito en el contexto de los métodos para seleccionar una terapia y se aplican igualmente en el contexto del presente método terapéutico.

5 El uso terapéutico según la invención comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de un sujeto.

Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano, conejo, cobaya, rata, macaco o hámster. Más preferiblemente, el sujeto es humano.

10 En una forma de realización preferida, las variaciones en el número de copias se evalúan mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR).

15 En una forma de realización preferida, los cebadores usados en la RT-PCR comprenden las secuencias de SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. En una forma de realización aún más preferida, la detección de los amplicones se lleva a cabo usando una sonda de detección que comprende la secuencia de SEQ ID NO:9. La sonda de detección preferiblemente se marca con FAM.

20 En una forma de realización preferida, los cebadores usados en la RT-PCR comprenden las secuencias de SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17. En una forma de realización aún más preferida, la detección de los amplicones se lleva a cabo usando una sonda de detección que comprende la secuencia de SEQ ID NO:18. La sonda de detección preferiblemente se marca con FAM.

25 En otra forma de realización, la variación en el número de copias de *DEFA1A3*, se determina como una variación en el número de copias en el alelo DEFA1, en el alelo DEFA3 o en ambos alelos. En una forma de realización preferida, la determinación de número de copias en los alelos DEFA1 y/o DEFA3 se lleva a cabo mediante pirosecuenciación. En una forma de realización aún más preferida, los cebadores de amplificación por PCR usados en la pirosecuenciación comprenden las secuencias SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14. En aún otra realización, el cebador de secuenciación usado en la reacción de pirosecuenciación comprende la secuencia de SEQ ID NO:15.

35 En una forma de realización preferida, la muestra biológica se selecciona del grupo que una biopsia o una muestra de líquido corporal. Las muestras de líquido corporal pueden ser muestras de sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, leche o líquido ductal y puede ser asimismo reciente, congelada o fijada. Preferiblemente, las muestras contienen material biológico adecuado para detectar el biomarcador adecuado (ADN), por tanto, dicha muestra debe comprender, ventajosamente, material celular. Los ejemplos de la muestra biológica incluyen sangre completa, PBMC y células T. Los métodos para recoger y preparar estas muestras biológicas se conocen en la técnica. En una forma de realización particular, la muestra es una muestra de líquido corporal tal como una muestra de sangre; preferiblemente, la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del sujeto.

40 Una vez se ha determinado el número de copias del gen *DEFA1A3*, la invención proporciona un método para el tratamiento de pacientes que muestran un número de copias disminuido de *DEFA1A3* con respecto a un valor de referencia.

45 Como se usa en el presente documento, "disminuido", se refiere al número de copias de *DEFA1A3* que es al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 menor que el valor de referencia.

50 En un aspecto, se tratan pacientes que contienen 9 o menos copias del gen *DEFA1A3*. En otro aspecto, se seleccionan pacientes para el tratamiento cuando contienen menos de 5 copias del gen *DEFA1A3*.

55 Las terapias adecuadas que se pueden administrar a un paciente seleccionado en base del número de copias de *DEFA1A3* con respecto a un valor de referencia incluyen, sin limitación, una terapia antiviral de gran actividad (TARGA), un inhibidor de proteasa, un inhibidor de fusión, un inhibidor de integrasa, un inhibidor de transcriptasa inversa y terapia de vacuna con un inmunógeno de VIH.

60 5. Kits

65 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende reactivos adecuados para detectar una variación en el número de copias de *DEFA1A3*. En una forma de realización particular, los reactivos comprenden al menos un oligonucleótido contiguo que hibrida con un fragmento del genoma del individuo que comprende al menos una VNC. En otra forma de realización, los reactivos comprenden al menos un par de oligonucleótidos que hibridan con hebras opuestas de un segmento genómico obtenido de un sujeto, en donde cada par de cebadores oligonucleotídicos se diseña para amplificar selectivamente un fragmento del genoma del individuo que incluye al

menos una VNC, o un fragmento de una VNC. Sin embargo, se contempla que el fragmento pueda ser de cualquier otro tamaño adecuado apropiado para su uso en los kits útiles para practicar la presente invención. Tales oligonucleótidos o ácidos nucleicos (por ejemplo, sondas oligonucleotídicas marcadas, cebadores oligonucleotídicos) se pueden diseñar usando partes de la secuencia de ácido nucleico de una VNC. En otra forma de realización, el kit comprende uno o más ácidos nucleicos marcados capaces de la detección específica de alelo de uno o más marcadores polimórficos específicos o haplotipos en LD con una VNC y reactivos para la detección del marcador. Los marcadores adecuados incluyen, pero no están limitados a, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un marcador cofactor enzimático, un marcador magnético, un marcador de espín o un marcador epítipo.

En ciertas formas de realización, el fragmento tiene al menos 20 nucleótidos de tamaño. En otras formas de realización, el fragmento tiene al menos 30 nucleótidos de tamaño, al menos 50 nucleótidos de tamaño, al menos 100 nucleótidos de tamaño, al menos 200 nucleótidos de tamaño, al menos 300 nucleótidos de tamaño, al menos 500 nucleótidos de tamaño, al menos 1000 nucleótidos de tamaño, al menos 5000 nucleótidos de tamaño, o al menos 10000 nucleótidos de tamaño.

Los kits útiles en los métodos de la invención comprenden componentes útiles en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos, sondas de hibridación para VNC u otros marcadores de detección, enzimas de restricción (por ejemplo, para análisis de RFLP), sondas de ácidos nucleicos, opcionalmente marcadas con marcadores adecuados (por ejemplo, marcadores fluorescentes), oligonucleótidos específicos de alelo (por ejemplo, sondas específicas de alelo de SNP o específicas de alelo de VNC), anticuerpos que se unen a un polipéptido alterado codificado por un ácido nucleico de la invención como se describe en el presente documento o a un polipéptido no alterado (nativo) codificado por un ácido nucleico de la invención como se describe en el presente documento, medios para la amplificación de VNC o fragmentos de VNC como se describe en el presente documento, medios para analizar la secuencia de ácido nucleico de los ácidos nucleicos que comprenden VNC como se describe en el presente documento, medios para analizar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por una VNC, o un ácido nucleico asociado con (en LD con) una VNC. Los kits pueden incluir, por ejemplo, tampones necesarios, cebadores de ácidos nucleicos para amplificar ácidos nucleicos y reactivos para la detección específica de alelo de los fragmentos amplificados usando tales cebadores y enzimas necesarias (por ejemplo, ADN polimerasa). Además, los kits pueden proporcionar reactivos para ensayos que se van a usar en combinación con los métodos de la presente invención (por ejemplo, reactivos para su uso con otros ensayos diagnósticos tal como esquizofrenia).

En una forma de realización preferida, los reactivos adecuados para detectar una variación en el número de copias de *DEFA1A3* incluyen un primer conjunto de cebadores adecuados para la amplificación de una región dentro del gen *DEFA1A3* y al menos una sonda capaz de hibridar con la región dentro del gen *DEFA1A3* que se ha amplificado usando los cebadores. En una forma de realización aún más preferida, el primer conjunto de cebadores comprende cebadores que pueden hibridar con una región dentro del gen *DEFA1A3* comprende las secuencias de SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 o variantes de las mismas que son capaces de hibridar específicamente con dicha región dentro del gen *DEFA1A3*.

En una forma de realización aún más preferida, el primer conjunto de cebadores comprende cebadores que pueden hibridar con una región dentro del gen *DEFA1A3* comprende las secuencias de SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17 o variantes de las mismas que son capaces de hibridar específicamente con dicha región dentro del gen *DEFA1A3*.

En una forma de realización preferida, la sonda que puede hibridar con una región dentro del gen *DEFA1A3* que se ha amplificado usando el primer conjunto de cebadores comprende la secuencia de SEQ ID NO:9 o una variante de la misma capaz de hibridar específicamente con la misma región dentro del gen *DEFA1A3* que se ha amplificado usando el primer conjunto de cebadores.

En una forma de realización preferida, la sonda que puede hibridar con una región dentro del gen *DEFA1A3* que se ha amplificado usando el primer conjunto de cebadores comprende la secuencia de SEQ ID NO:18 o una variante de la misma capaz de hibridar específicamente con la misma región dentro del gen *DEFA1A3* que se ha amplificado usando el primer conjunto de cebadores.

En una forma de realización, el kit de la invención comprende además un segundo conjunto de cebadores adecuados para la amplificación de una región dentro la región génica de *DEFA1A3* amplificada con el primer conjunto de cebadores. En una forma de realización más preferida, el segundo conjunto de cebadores comprende las secuencias de SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14 o una variante de cualquiera de dichas secuencias que hibridan específicamente con la misma región del gen *DEFA1A3*.

En otra forma de realización, el kit de la invención comprende además un cebador de secuenciación que es adecuado para distinguir el gen *DEFA1* del gen *DEFA3*. En una forma de realización aún más preferida, el

cebador de secuenciación comprende la secuencia de SEQ ID NO:15 o una variante de la misma que hibrida específicamente con la misma región del gen *DEFA1A3*.

Se entenderá que las formas de realización de la invención incluyen sondas que tienen moléculas colorantes fluorescentes, compuestos fluorescentes u otros grupos fluorescentes. Una molécula colorante puede fluorescer, o ser inducida a fluorescer tras la excitación mediante la aplicación de una energía de excitación adecuada (por ejemplo, energía electromagnética de longitud de onda adecuada), y también puede absorber la energía electromagnética ("extinguir") emitida por otra molécula colorante o grupo fluorescente. Se puede usar cualquier molécula colorante, compuesto o grupo fluorescente en la práctica de la invención. Por ejemplo, los compuestos, colorantes fluorescentes y otros grupos fluorescentes adecuados incluyen, fluoresceína, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), 2 T-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxirodamina (JOE), 2'-cloro-5'-fluoro-7',8'-fusionado fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (NED) y 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC), colorantes de cianina (por ejemplo, Cy 3, Cy 5, Cy 9, azul de nitrotiazol (NTB)), Cys3, FAM™, tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), tetrapropano-6-carboxirodamina (ROX), fluoruro de dipirrometeno y boro (Bodipy), dicloro-fluoresceína, dicloro-rodamina, fluoresceína tiosemicarbazida (FTC), cloruro ácido de sulforodamina 101 (Texas red), ficoeritrina, rodamina, carboxitetrametilrodamina, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), un colorante indopiras, ácido pireniloxitrisulfónico (azul cascade), 514 ácido carboxílico (verde Oregón), eosina, eritrosina, piridiloxazol, benzoxadiazol, aminonaptaleno, pireno, maleimida, una cumarina, 4-fluoro-7-nitrobenofurazano (NBD), 4-amino-N-[3-(vinilsulfonyl)-fenil]naftalimida-3,6-disulfonato) (amarillo Lucifer), DABCYL, DABSYL, antraquinona, verde malaquita, nitrotiazol, y compuestos de nitroimidazol, yoduro de propidio, porfirinas, criptatos de lantamida, quelatos de lantamida, derivados y análogos de los mismos (por ejemplo isómeros 5-carboxi de colorantes de fluoresceína), y otros colorantes fluorescentes y moléculas y compuestos fluorescentes.

Los kits también pueden incluir cebadores y sondas específicas para un gen que se sabe se da en una única copia en el genoma. Esto permite la determinación de la VNC mediante qRT-PCR dúplex. En una forma de realización preferida, los cebadores y sondas son específicos para el gen de la albúmina. En una forma de realización más preferida, los cebadores de amplificación para el gen de la albúmina comprenden las secuencias SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11. En otra forma de realización preferida, la sonda para el gen de la albúmina comprende la secuencia SEQ ID NO:12.

En una forma de realización preferida, los cebadores y sondas son específicos para el gen *DEFB1* o *RNasa-P*. En una forma de realización más preferida, los cebadores de amplificación para el gen *DEFB1* comprenden las secuencias SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20. En otra forma de realización preferida, la sonda para el gen *DEFB1* comprende la secuencia SEQ ID NO:21.

En una forma de realización más preferida, los cebadores de amplificación para el gen *RNasa-P* comprenden las secuencias SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23. En otra forma de realización preferida, la sonda para el gen *RNasa-P* comprende la secuencia SEQ ID NO:24.

Los kits según la invención pueden contener opcionalmente reactivos para la extracción de ADN de muestras y/o reactivos para la amplificación de ADN. Además, los kits pueden comprender opcionalmente el/los reactivo(s) con una descripción o etiqueta o instrucciones identificadoras referidas a su uso en los métodos de la presente invención. Los kits pueden comprender envases (incluyendo placas de microlitros adecuadas para el uso en una implementación automatizada del método), cada uno con uno o más de los varios reactivos (típicamente en forma concentrada) utilizados en los métodos, incluyendo, por ejemplo, micromatrices prefabricadas, tampones, los nucleótidos trifosfato adecuados (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP; o rATP, rCTP, rGTP y UTP), transcriptasa inversa, ADN polimerasa, ARN polimerasa, y una o más sondas y cebadores de la presente invención (por ejemplo, poli(T) de la longitud apropiada o cebadores al azar unidos a un promotor reactivo con la ARN polimerasa). También son adecuadamente componentes potenciales de los kits los algoritmos matemáticos usados para estimar o cuantificar la información pronóstica o predictiva.

Ciertas formas de realización de la sonda de detección y/o los cebadores usados para la amplificación del molde por PCR incluyen el uso de bases modificadas, incluyendo A modificada y G modificada. El uso de bases modificadas puede ser útil para ajustar la temperatura de fusión de la molécula de nucleótidos (sonda y/o cebador) al ADN molde, por ejemplo, para aumentar la temperatura de fusión en regiones que contienen un bajo porcentaje de bases G o C, en los que se puede usar A modificada con la capacidad de formar tres puentes de hidrógeno con su T complementaria, o para disminuir la temperatura de fusión en regiones que contienen un alto porcentaje de bases G o C, por ejemplo, usando bases G modificadas que forman solo dos puentes de hidrógeno con su base C complementaria en una molécula de ADN bicatenario. En una forma de realización preferida, las bases modificadas se usan en el diseño de la sonda nucleotídica de detección. Se puede seleccionar cualquier base modificada que conozca el experto en la materia en estos métodos, y la selección de bases adecuadas está dentro del ámbito del experto en la materia basándose en las enseñanzas del presente documento y bases conocidas disponibles de fuentes comerciales como sabe el experto en la materia.

En ciertas formas de realización, el kit contiene además un conjunto de instrucciones para usar los reactivos que comprenden el kit.

5 Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en su totalidad mediante referencia. Habiéndose descrito ahora la invención en general, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

10

Procedimientos generales

1. Grupo de estudio

15 Se incorporaron parejas serodiscordantes en un único centro (Hospital Clínic de Barcelona, España). Se incorporaron cuando se diagnosticó a parejas con infección por VIH. Los criterios de inclusión eran antecedentes de relaciones sexuales no protegidas de forma continuada durante al menos 12 meses; 5 relaciones sexuales no protegidas en los últimos 3 meses, con al menos 1 en las 4 semanas antes de la inclusión en el estudio; y 1 paciente infectado por VIH-1 por pareja con una PVL > 2000 copias/ml. Se excluyeron individuos con múltiples parejas. Se incorporaron individuos infectados con VIH-1 (n=70) y no infectados por VIH-1 (sanos n=58) coincidentes en sexo y edad como grupo de VIH y sano.

20

2. Generación de células dendríticas derivadas de monocitos (CDDM)

25 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) inmediatamente después de la extracción venosa usando un gradiente de Ficoll estándar. Las células se procesaron inmediatamente después del aislamiento. Para obtener monocitos humanos, las PBMC se incubaron en placas de plástico (2 horas a 37°C) en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% en medio de CDDM (medio XVIVO-15 sin suero) suplementado con suero autólogo al 1%, gentamicina y fungizona y zidovudina 1 µM para evitar la infección con VIH. Para obtener CDDM inmaduras, las células adherentes se lavaron cuatro veces con medio de CDDM y después se cultivaron durante 5 días en presencia de 1000 UI/ml cada uno de IL-4 humana recombinante y GM-CSF humano recombinante los días 0 y 2.

30

3. Determinación de proteína HNP 1-3, citoquina y quimioquina

35 Se cuantificaron los niveles de α-defensinas 1-3 en sobrenadantes de cultivo sin células y plasma usando el kit de prueba ELISA de HNP 1-3 (Hycult Biotech BV, Uden, NL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de CDDM inmaduras se recogieron el día 5 del cultivo celular de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF. La secreción de citoquinas por las CDDM infectadas se determinó en 50 µl de sobrenadantes de cultivo (después de 5 días de derivación de CDi) por tecnología Luminex (Panel de citoquinas humanas 25-Plex que incluye Eotaxina / GM-CSF / IL-1β / IL-1RA / IL-2 / IL-2R / IL-4 / IL-5 / IL-6 / IL-7 / IL-8 / IL-10 / IL-12p40 / p70 / IL-13 / IL-15 / IL-17 / IFN-α / IFN-γ / IP-10 / MCP-1 / MIG / MIP-1α / MIP-1β / RANTES / TNF-α) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

40

4. Variabilidad del número de copias de DEFA1A3

45 Se evaluó la variabilidad del número de copias del gen *DEFA1A3* usando un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real dúplex con modificaciones previamente descritas. Véase, Nuytten H, *et al.*, J. Heart Lung Transplant. 2009; 28:S106.

50

5. Tinción intracelular de α-defensinas 1-3

La tinción intracelular de α-defensinas 1-3 se realizó como se ha descrito previamente con modificaciones menores. Véase, Rodríguez-García M, *et al.*, J. Leuk. Biol. 2007; (82):1143-1146. Brevemente, se pretrataron CDDM inmaduras con monesina (Golgi Stop, BD Biosciences Corp., San Diego, CA, EE UU) durante 8 horas y se tiñó la superficie con CD40 conjugado con FITC (BD Biosciences Corp., San Diego, CA, EE UU). A continuación, las CDDM se fijaron y permeabilizaron con el kit Cuytofix-Cytoperm Plus (BD Biosciences Corp., San Diego, CA, EE UU) durante 20 minutos, se incubaron con un Acm de ratón biotilado anti- α-defensinas 1-3 humanas (clon D21, Hycult Biotech BV, Uden, NL) durante 30 minutos y después con estreptavidina conjugada con PE (1/1000) durante 30 minutos. El control negativo fue isotipo control conjugado a FITC (BD Biosciences Corp., San Diego, CA, EE UU) e isotipo control IgG1 de ratón conjugado a biotina (Southern Biotech Corp., Birmingham, AL, EE UU). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson Labware Inc., Franklin Lakes, NJ, EE UU). Los datos obtenidos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EE UU). La expresión de marcadores de superficie e intracelulares se midió mediante el porcentaje de células positivas y media geométrica de la intensidad de fluorescencia.

60

65

6. Microscopía de fluorescencia

El análisis incluyó la tinción del núcleo con DAPI y las células se adhirieron sobre un portaobjetos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, EE UU) durante 30 minutos. Las células se observaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 (Nikon Corp., Tokio, JP) para fluorescencia verde, roja y azul usando un objetivo 40x.

7. Ensayos de transfección de VIH

Los ensayos se realizaron en individuos sanos con una VNC alta (≥ 9) frente a esos con una VNC baja (≤ 4). Se infectaron CD autólogas a dosis bajas (MOI=1) y se cocultivaron *ex vivo* con PBMC con monocitos propios eliminados activadas con PHA. Se cuantificaron los niveles de p24 mediante ELISA durante 10 días.

8. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San diego, CA, EE UU). Las pruebas no paramétricas U-Mann Whitney para la comparación de dos grupos. Para el análisis de correlación se aplicó la prueba no paramétrica de Pearson. Para todas las pruebas usadas, un valor de p bilateral $< 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 1

Se recogieron sobrenadantes de CD derivadas de monocitos sanos (n=38) así como de EU (n=20) y se determinaron los niveles de la proteína HNP 1-3 y 25 citoquinas mediante ELISA y tecnología Luminex, respectivamente.

Se abordó la VNC de *DEFA1A3* mediante qRT-PCR dúplex en individuos sanos (n=60) y EU (n=31). Se desarrolló un ensayo basado en PCR cuantitativa en tiempo real dúplex para la detección del número de copias de ADN genómico de *DEFA1A3* usando el gen *DEFB1* como referencia y en algunos casos se usó el gen *RNasa-P* como referencia. Las secuencias de los cebadores y sondas fueron como sigue:

- 1) *DEFA1A3* cebador directo: 5'-CTC CAG GCA AGA GCT GAT GAG-3' (SEQ ID NO:16);
- 2) *DEFA1A3* cebador inverso: 5'-TGG GAT GTC CGC TGC AAT-3' (SEQ ID NO:17);
- 3) *DEFA1A3* sonda: 5'-6FAM-TTG CTG CAG CCC CGG AGC A-TAMRA-3' (SEQ ID NO:18);
- 4) *DEFB1* cebador directo: 5'-TTG CGT CAG CAG TGG AGG-3' (SEQ ID NO:19);
- 5) *DEFB1* cebador inverso: 5'-AAC AGG TGC CTT GAA TTT TGG T-3' (SEQ ID NO:20);
- 6) *DEFB1* sonda: 5'-YAK-CAATGTCTCTATTCTGCCTGCCCGATCTT-TAMRA-3' (SEQ ID NO:21);
- 7) *RNasa-P* cebador directo 5'- AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3' (SEQ ID NO:22);
- 8) *RNasa-P* cebador inverso 5'- GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3' (SEQ ID NO:23); y
- 9) *RNasa-P* sonda: 5'-YAK-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-TAMRA-3' (SEQ ID NO:24).

Se realizaron carreras de optimización para definir las concentraciones limitantes de cebador para el ensayo dúplex.

Los ensayos de transfección de VIH se realizaron en individuos sanos con una VNC alta (≥ 9) frente a aquellos con una VNC baja (≤ 4). Se infectaron CD autólogas a dosis bajas (MOI=1) y se cocultivaron *ex vivo* con PBMC con monocitos propios eliminados activadas. Se cuantificaron los niveles de P24 mediante ELISA.

Los individuos EU mostraron mayor secreción de HNP 1-3 (media=1328,7 pg/ml) comparados con los individuos sanos (media=445,5 pg/ml, $p=0,0008$). Véanse las figuras 1 y 3. Además, se encontró que la VNC mediana de EU era mayor que la de individuos sanos (7 frente a 6 copias, $p=0,025$). Véanse las figuras 2 y 4. Los ensayos de transfección funcional usando CD infectadas con VIH mostraron una protección a VIH 5 veces mayor en individuos con VNC elevada comparados con individuos con VNC baja. Por último, las CD de individuos sanos con VNC elevada (VNC ≥ 9) secretaban mayores cantidades de IL-8 ($p<0,0001$), IL1-RA ($p=0,004$), IL-6, MCP-1, IL-1- β , IL-7 y MIP-1 β ($p<0,05$). Estos resultados demuestran que la VNC elevada de *DEFA1A3* confiere protección a VIH. Véanse las figuras 5 y 6.

Ejemplo 2

Se realizó el mismo experimento usando diferentes cebadores para la amplificación de *DEFA1A3* (SEQ ID NO: 7-9) y diferentes cebadores para genes de referencia (SEQ ID NO: 10-12) y se produjo la misma conclusión. Se

recogieron sobrenadantes de CD derivadas de monocitos de sanos (n=38), así como de EU (n=20) y se determinaron los niveles de la proteína HNP 1-3 y 25 citoquinas mediante ELISA y tecnología Luminox, respectivamente.

5 Se abordó la VNC de *DEFA1A3* mediante qRT-PCR dúplex en individuos sanos (n=60) y EU (n=31). Se desarrolló un ensayo basado en PCR cuantitativa en tiempo real dúplex para la detección del número de copias de ADN genómico de *DEFA1A3* usando el gen de la albúmina como referencia. Las secuencias de los cebadores y sondas fueron como sigue:

- 10
- 1) *DEFA1A3* cebador directo: 5'-CAG CCC CGG AGC AGA TT-3' (SEQ ID NO:7);
 - 2) *DEFA1A3* cebador inverso: 5'-CAA GCT TTC GTC CCA TGC A-3' (SEQ ID NO:8);
 - 3) *DEFA1A3* sonda: 5'-FAM-CGG ACA TCC CAG AAG TGG TTG TTT CC-MGB-3' (SEQ ID NO:9);
 - 4) *ALB* cebador directo: 5'-AGT CAC CAA ATG CTG CAC AGA A-3' (SEQ ID NO:10);
 - 5) *ALB* cebador inverso: 5'-TCA TCG ACT TCC AGA GCT GAA A-3' (SEQ ID NO:11); y
- 15
- 6) *ALB* sonda: 5'-VIC-CCT TGG TGA ACA GGC GAC CAT GC-MGB-3' (SEQ ID NO:12)

Se realizaron carreras de optimización para definir las concentraciones limitantes de cebador para el ensayo dúplex.

20 Se cuantificaron los porcentajes relativos de los alelos *DEFA1* y *DEFA3* mediante pirosecuenciación y se convirtieron en número de copias multiplicando por el número de copias de *DEFA1A3* total calculado de la PCR cuantitativa. Los cebadores para el ensayo de pirosecuenciación se diseñaron mediante el uso de software de diseño de ensayo PSQ versión 1.0.6. Los cebadores para el amplicón *DEFA1A3* fueron 5'-biotina-CCAGGCTCAAGGAAAAACA-3' (SEQ ID NO:13) y 5'-TTCCATAGCGACGTTCTCCT-3' (SEQ ID NO:14), y el

25

cebador de secuenciación fue 5'-GCACGCTGGTATTCTG-3' (SEQ ID NO:15). Las reacciones de PCR (50 µl) se realizaron con 4-20 ng de ADN molde. Se usaron treinta microlitros del producto de PCR para la reacción de pirosecuenciación, que se realizó según las recomendaciones del fabricante en el pirosecuenciador PSQ 96 MA (Qiagen NV, Venlo, NL). Los porcentajes relativos de las dos variantes se calcularon mediante el uso del software acompañante. El número de copias individuales de *DEFA1* y *DEFA3* se obtuvieron multiplicando los

30

porcentajes relativos por el número de copias de *DEFA1A3* total determinado inicialmente.

Los ensayos de transfección de VIH se realizaron en individuos sanos con una VNC alta (≥ 9) frente a esos con una VNC baja (≤ 4). Se infectaron CD autólogas a dosis bajas (MOI=1) y se cocultivaron *ex vivo* con PBMC con monocitos propios eliminados activadas. Se cuantificaron los niveles de P24 mediante ELISA.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar la probabilidad de que un sujeto se infecte por VIH o se convierta en un paciente sin progresión a largo plazo tras la exposición al VIH que comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de dicho sujeto;

5

en donde un número de copias de *DEFA1A3* aumentado con respecto a un valor de referencia es indicativo de una probabilidad aumentada del sujeto de no infectarse o de convertirse en un paciente sin progresión a largo plazo si se infecta;

10

o,

en donde un número de copias de *DEFA1A3* disminuido con respecto a un valor de referencia es indicativo de una probabilidad aumentada de que el sujeto se infecte o de que se convierta en un paciente crónico con progresión.
- 15 2. Un método *in vitro* de seleccionar una terapia para la infección por VIH o para una enfermedad asociada con la infección por VIH para un sujeto que comprende evaluar la variación en el número de copias de *DEFA1A3* en una muestra biológica de dicho sujeto en donde si el sujeto muestra un número de copias de *DEFA1A3* disminuido con respecto a una muestra de referencia, se selecciona una terapia del grupo que consiste en terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión, inhibidores de integrasa, inhibidores de transcriptasa inversa y terapia de vacuna con un inmunógeno de VIH.
- 20 3. El método *in vitro* según las reivindicaciones 1 o 2 en donde un número de copias aumentado con respecto a un valor de referencia indica al menos 5 copias o un número de copias disminuido con respecto a un valor de referencia indica menos de 5 copias.
- 25 4. El método *in vitro* según la reivindicación 3 en donde un número de copias aumentado con respecto a un valor de referencia indica al menos 9 copias o un número de copias disminuido con respecto a un valor de referencia indica menos de 9 copias.
- 30 5. El método *in vitro* según las reivindicaciones 1 o 2 en donde se usa el gen *DEFB1* o el gen *RNasa-P* como referencia.
- 35 6. El método *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 5 en donde la evaluación de la variación en el número de copias de *DEFA1A3* se lleva a cabo mediante qRT-PCR.
7. El método *in vitro* según la reivindicación 6 en donde los cebadores de amplificación de PCR en la qRT-PCR comprenden las secuencias de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:17.
- 40 8. El método *in vitro* según la reivindicación 7 en donde la sonda de detección usada en la qRT-PCR comprende las secuencias de SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:18.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde la variación en el número de copias de *DEFA1A3* es una variación en el alelo *DEFA1* y/o en el alelo *DEFA3*.
- 45 10. El método según la reivindicación 9 en donde la determinación del número de copias de los alelos *DEFA1* y *DEFA3* se lleva a cabo mediante pirosecuenciación.
- 50 11. El método según la reivindicación 10 en donde los cebadores de amplificación de PCR usados en la pirosecuenciación comprenden las secuencias SEQ ID NO:13 y SEQ ID:14.
12. El método según la reivindicación 11 en donde el cebador de secuenciación usado en la reacción de pirosecuenciación comprende la secuencia de SEQ ID NO:15.
- 55 13. Un kit que comprende reactivos adecuados para detectar una variación en el número de copias de *DEFA1A3*.
14. El kit según la reivindicación 13 en donde dichos reactivos incluyen un primer conjunto de cebadores adecuados para la amplificación de una región en el gen *DEFA1A3* y al menos una sonda capaz de hibridar con la región dentro del gen *DEFA1A3* que se ha amplificado usando los cebadores.
- 60 15. El kit según la reivindicación 14 en donde los cebadores comprenden las secuencias de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:17.
- 65 16. El kit según las reivindicaciones 14 o 15 en donde la sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:18.

- 5
17. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 que comprende además un segundo conjunto de cebadores adecuados para la amplificación de una región dentro de la región del gen *DEFA1A3* amplificada con el primer par de cebadores.
18. El kit según la reivindicación 17 en donde los cebadores del segundo conjunto de cebadores comprenden las secuencias de SEQ ID NO:13 y SEQ ID:14.
- 10
19. El kit según las reivindicaciones 13 a 18 que comprende además un cebador de secuenciación adecuado para distinguir el gen DEFA1 del gen DEFA3.
20. El kit según la reivindicación 19 en donde el cebador de secuenciación comprende la secuencia de SEQ ID NO.15.

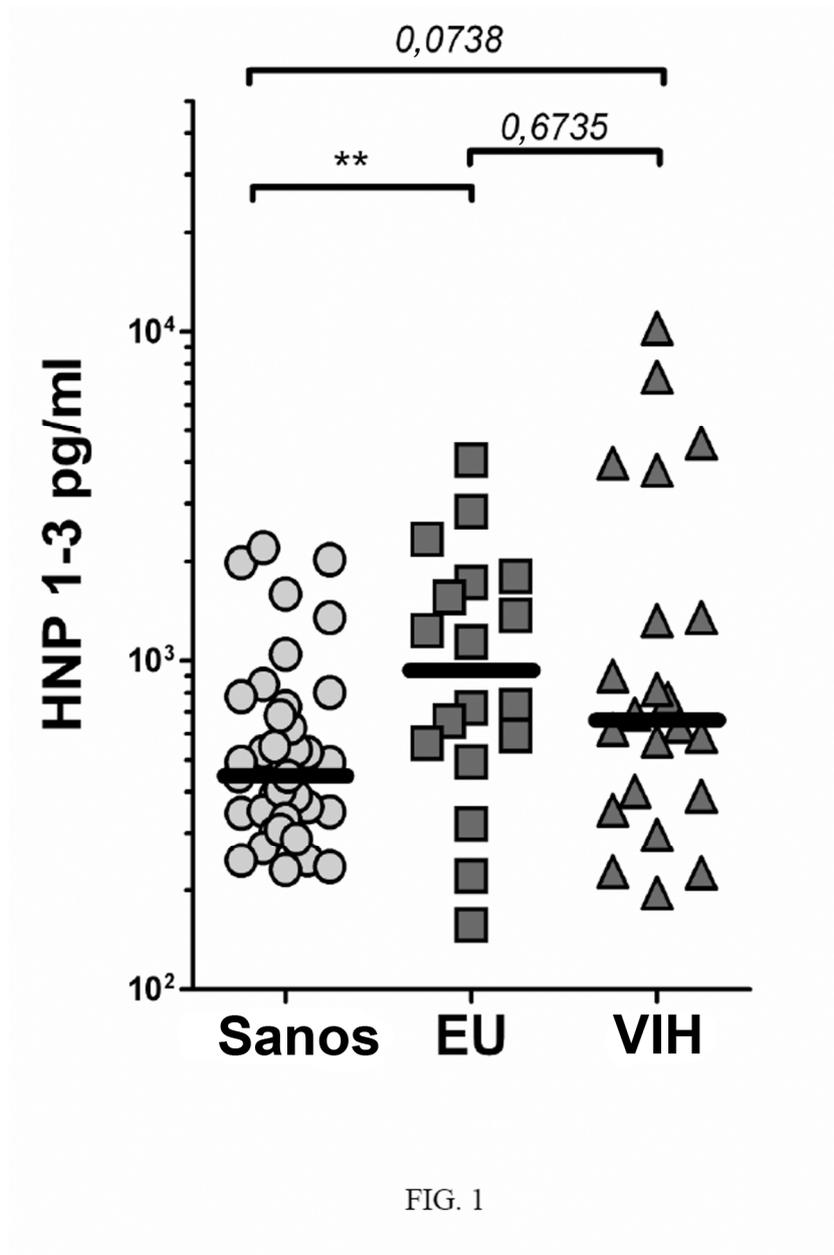
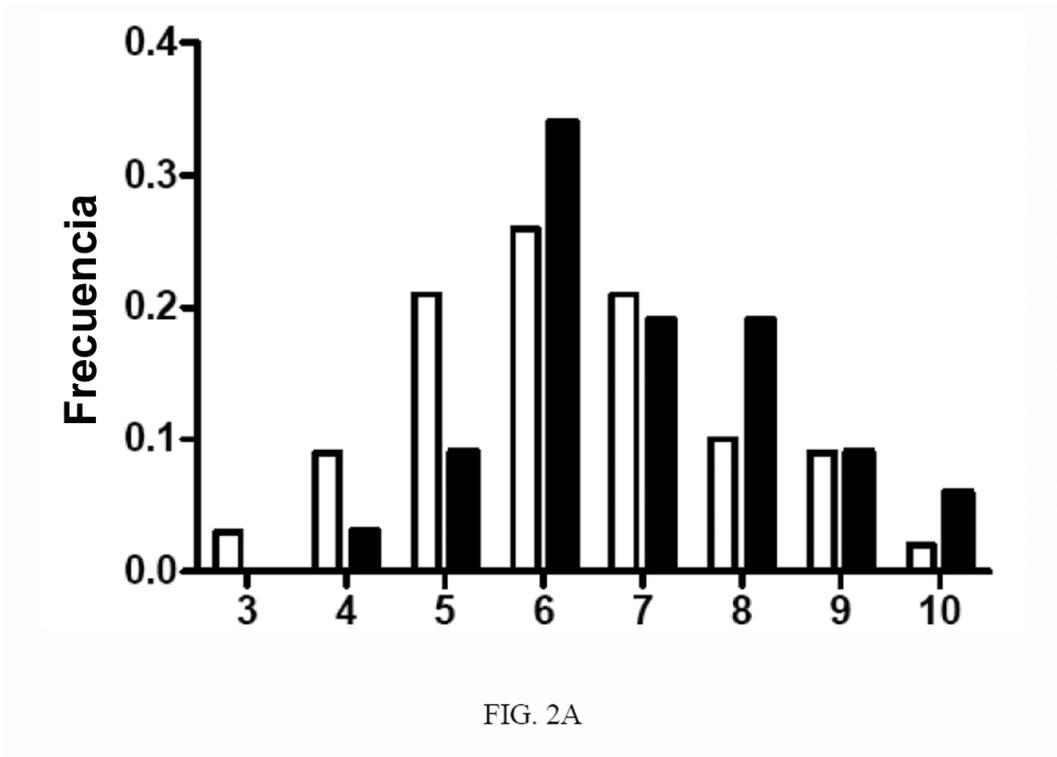


FIG. 1



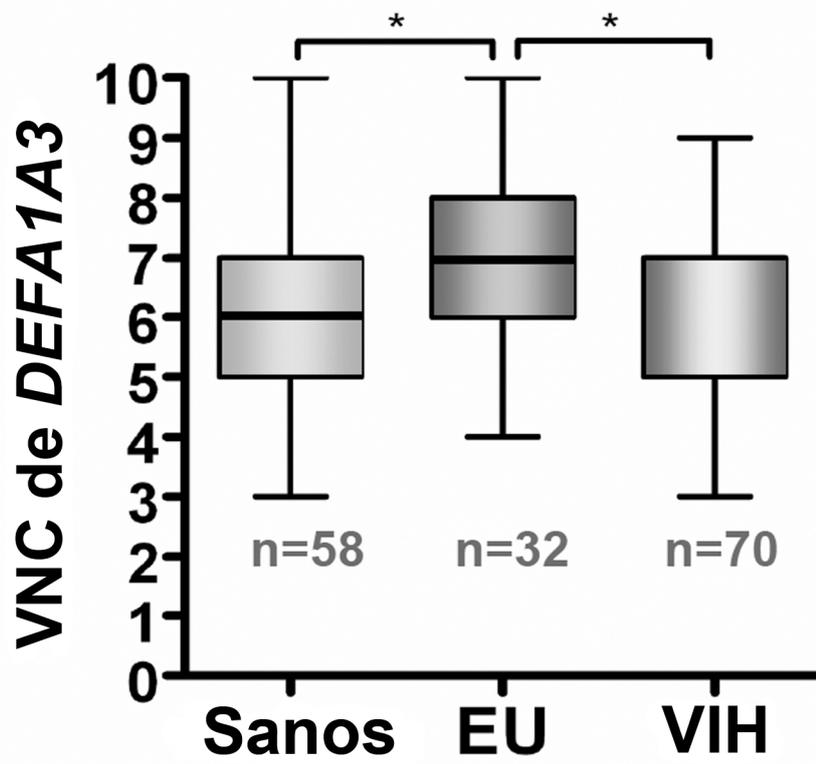


FIG. 2B

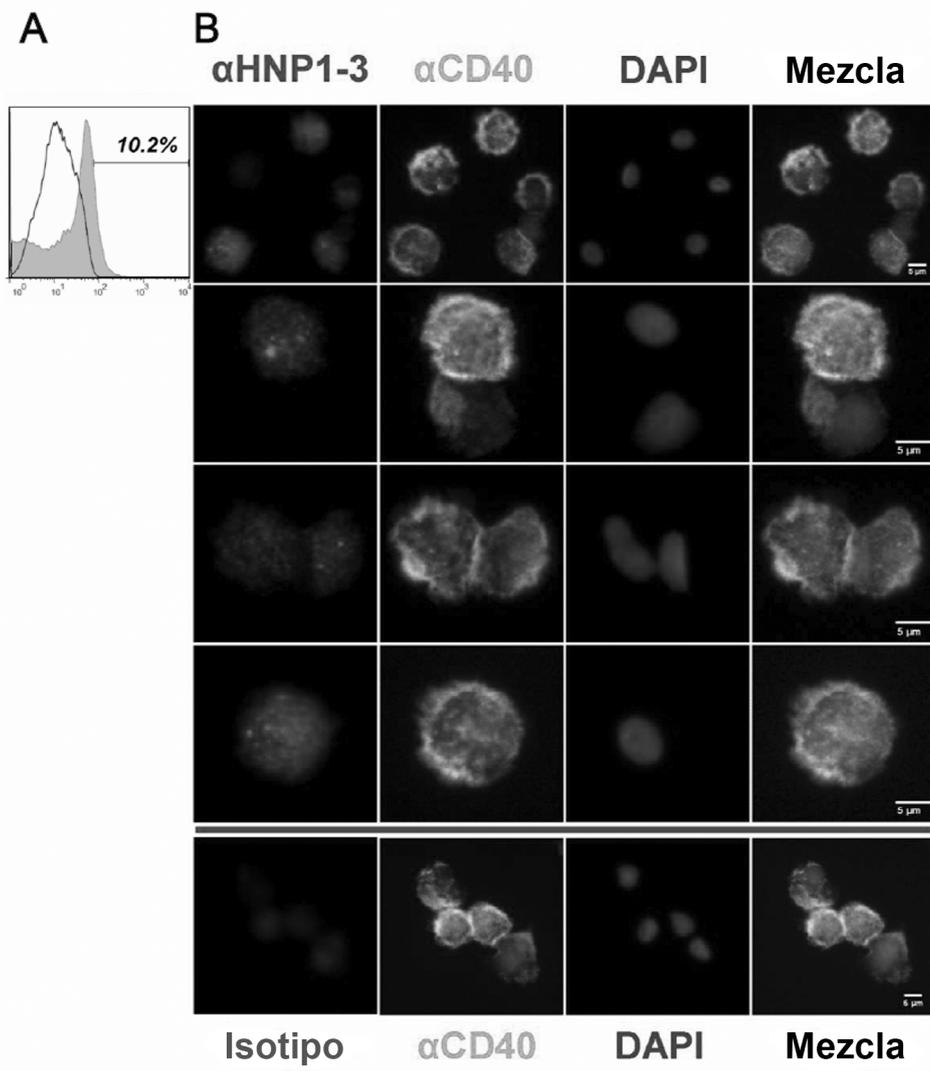


FIG. 3

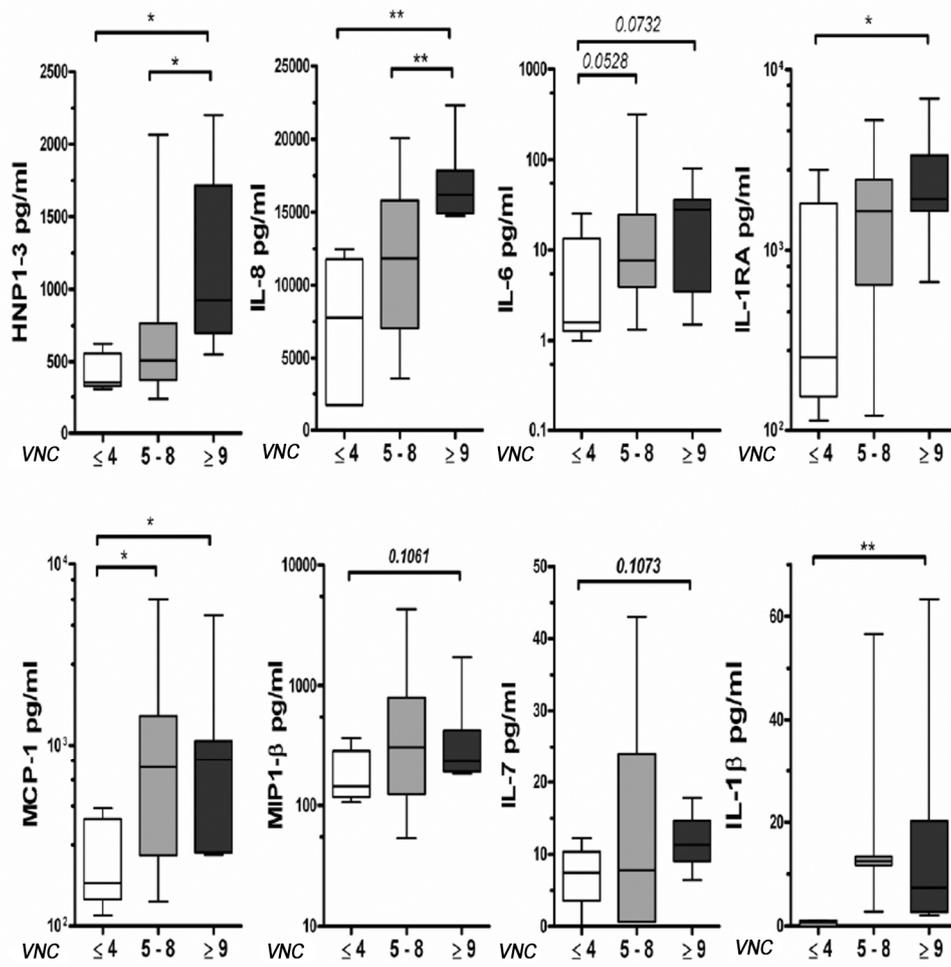


FIG. 4

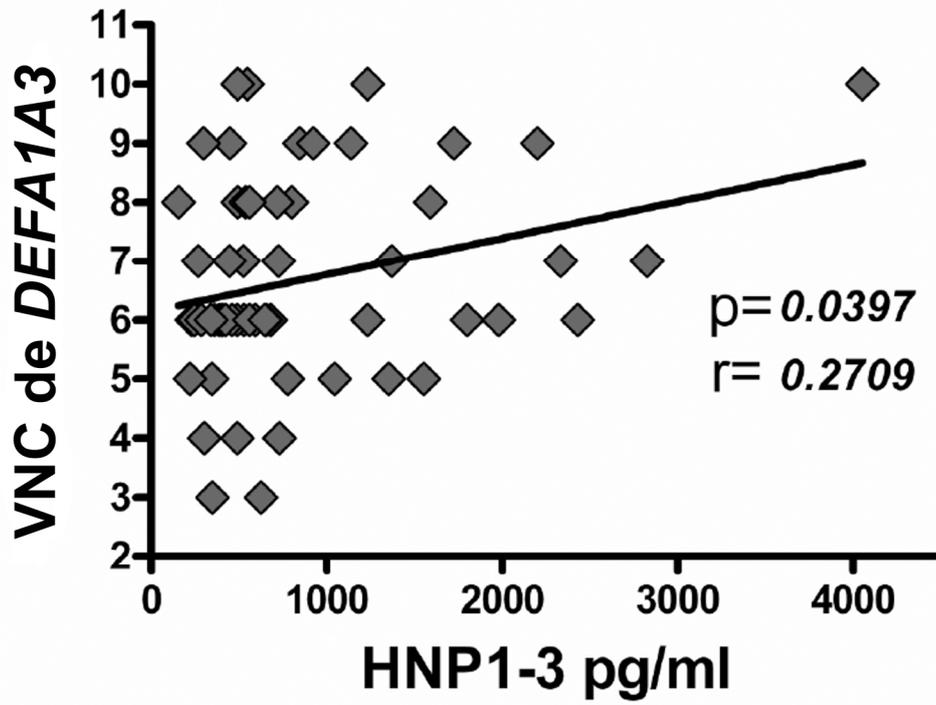


FIG. 5

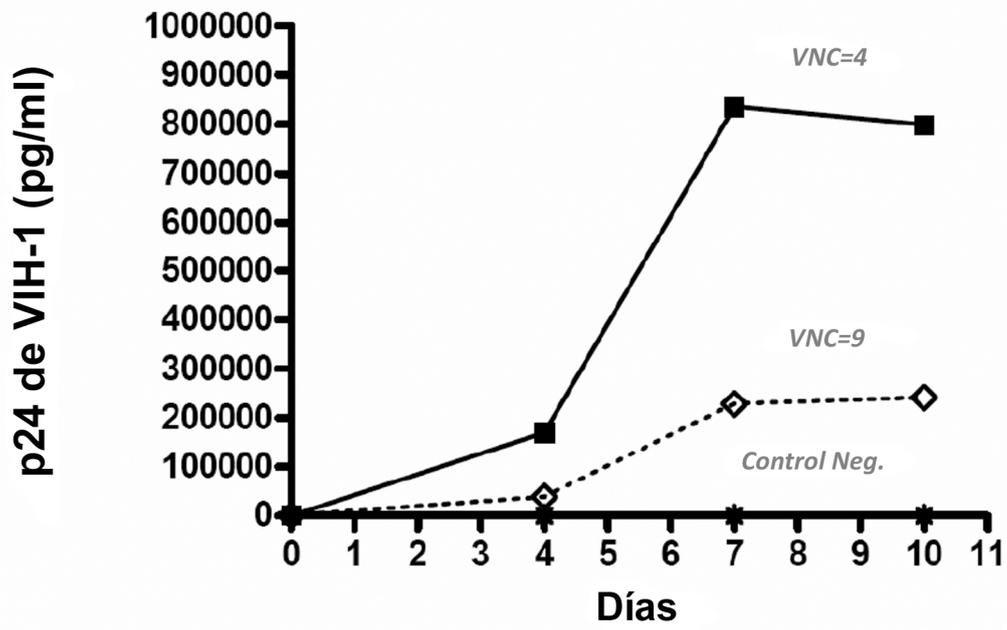


FIG. 6

ES 2 421 638 A2

<210> 4
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Cys Ser Cys Arg Leu Val Phe Cys Arg Arg Thr Glu Leu Arg Val
1 5 10 15

Gly Asn Cys Leu Ile Gly Gly Val Ser Phe Thr Tyr Cys Cys Thr Arg
20 25 30

Val

<210> 5
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Arg Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Thr Gly Arg Cys Ala Thr Arg Glu
1 5 10 15

Ser Leu Ser Gly Val Cys Glu Ile Ser Gly Arg Leu Tyr Arg Leu Cys
20 25 30

Cys Arg

<210> 6
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Arg Ala Phe Thr Cys His Cys Arg Arg Ser Cys Tyr Ser Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Ser Tyr Gly Thr Cys Thr Val Met Gly Ile Asn His Arg Phe Cys
20 25 30

Cys Leu

<210> 7
<211> 17

ES 2 421 638 A2

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> DEFA1A3 oligo sentido

 <400> 7
 cagccccgga gcagatt 17

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> DEFA1A3 oligo antisentido

 <400> 8
 caagctttcg tcccatgca 19

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Sonda DEFA1A3

 <400> 9
 cggacatccc agaagtgggtt gtttcc 26

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> ALB oligo sentido

 <400> 10
 agtcaccaaa tgctgcacag aa 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> ALB oligo antisentido

 <400> 11
 tcatcgactt ccagagctga aa 22

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA

ES 2 421 638 A2

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sonda ALB
 <400> 12
 ccttggtgaa caggcgacca tgc 23

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Amplicón DEFA1A3 oligo sentido
 <400> 13
 ccaggctcaa ggaaaaaca 19

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Amplicón DEFA1A3 oligo antisentido
 <400> 14
 ttccatagcg acgttctcct 20

<210> 15
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Amplicón DEFA1A3 oligo de secuenciación
 <400> 15
 gcacgctggt attctg 16

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> DEFA1A3 oligo sentido
 <400> 16
 ctccaggcaa gagctgatga g 21

<210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

ES 2 421 638 A2

<220>
 <223> DEFA1A3 oligo antisentido

 <400> 17
 tgggatgtcc gctgcaat 18

 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Sonda DEFA1A3

 <400> 18
 ttgctgcagc cccggagca 19

 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> DEFB1 oligo sentido

 <400> 19
 ttgcgtcagc agtggagg 18

 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> DEFB1 oligo antisentido

 <400> 20
 aacaggtgcc ttgaattttg gt 22

 <210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Sonda DEFB1

 <400> 21
 caatgtctct attctgcctg cccgatctt 29

 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

ES 2 421 638 A2

<220>
<223> RNase-P oligo sentido

<400> 22
agatttggac ctgcgagcg 19

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RNase-P oligo antisentido

<400> 23
gagcggctgt ctccacaagt 20

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda RNase-P

<400> 24
ttctgacctg aaggctctgc gcg 23