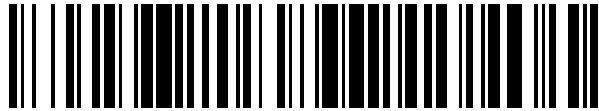


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 943**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2009 E 09782934 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2329266**

54 Título: **Monitorización e inhibición de infección por virus de la inmunodeficiencia humana mediante modulación del desencadenamiento dependiente de HMGB1 de la replicación y persistencia de VIH-1**

30 Prioridad:

**11.09.2008 US 96135 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.06.2016**

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)  
25-28 rue du Docteur Roux  
75724 Paris Cédex 15, FR**

72 Inventor/es:

**GOUGEON, MARIE-LISE;  
SAIDI, HELA;  
MELKI, MARIA-THÉRÈSE;  
POIRIER-BEAUDOIN, BÉATRICE y  
SEFFER, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 573 943 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Monitorización e inhibición de infección por virus de la inmunodeficiencia humana mediante modulación del desencadenamiento dependiente de HMGB1 de la replicación y persistencia de VIH-1

## Antecedentes de la invención

## Campo de la invención

Métodos de diagnóstico y de pronóstico que implican medir los niveles de HMGB1 y/o anticuerpos específicamente preparados frente a HMGB1. Métodos basados en anticuerpos y fármacos para tratar o reducir la intensidad de la infección por inmunodeficiencia humana mediante modulación de la actividad de HMGB1.

## Descripción de la técnica relacionada

Los estadios iniciales de la infección por VIH-1 están asociados con un reclutamiento local y activación de efectores importantes de la inmunidad innata, células NK y DC. En las primeras horas y días de infección mucosa, el VIH-1 atraviesa la barrera epitelial e infecta CD, macrófagos y células T que expresan CCR5 en los tejidos mucosos para iniciar la infección<sup>1,2</sup>. Las DC expresan CD4, CCR5, DC-SIGN<sup>3</sup> y otros receptores de lectina de tipo C (CLR) que facilitan la captura y diseminación de VIH-1<sup>4,5</sup>. Las DC inmaduras (iDC) capturan VIH-1 a través de CLR<sup>6</sup> y el virus capturado puede internalizarse y transmitirse rápidamente a células T CD4 cercanas, en forma de una sinapsis infecciosa<sup>7,8</sup>. Los conjugados de células DC-T facilitan la infección productiva en células T CD4<sup>9</sup>, y la diseminación de la infección a los ganglios linfáticos de drenaje y posteriormente a otros compartimentos de tejido linfoide se garantiza mediante DC portadoras de virus junto con macrófagos y células T CD4 infectados<sup>10</sup>.

La migración de iDC a una zona de células T de tejidos linfoides secundarios tras la captación del virus está asociada con un proceso de maduración que permite que la DC madura resultante (mDC) inicie una respuesta específica de antígeno<sup>11</sup>. Recientemente, se ha encontrado que el destino de DC depende extremadamente de células NK autólogas<sup>12</sup>. La interacción NK-iDC da como resultado la activación de células NK lo que, a su vez, induce la maduración o destrucción de DC, dependiendo de su densidad respectiva<sup>13, 14, 15</sup>. Las DC que experimentan maduración secretan varias citocinas, tales como IL-12 e IL-18, que actúan como potentes inductores de la activación y citotoxicidad de células NK<sup>16,17,18,19,20</sup>. A su vez, una vez activadas, las células NK producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que pueden inducir la maduración de DC. Este fenómeno depende del acoplamiento a NKp30 mediante ligandos expresados en iDC<sup>17,21</sup>, y la regulación por disminución sobre iDC de HLA-E, el ligando para el receptor inhibitor CD94/NKG2A<sup>22</sup>. Se propuso otro mecanismo que sugería que las células NK, activadas mediante IL-18 liberada mediante iDC en la hendidura sináptica, secretan HMGB1, que induce la maduración de DC y protege a las DC frente a la lisis<sup>20</sup>. HMGB1 es una proteína nuclear que está presente en casi todas las células eucariotas, y funciona para estabilizar la formación de nucleosomas, y actúa como proteína similar a factor de transcripción que regula la expresión de varios genes<sup>23,24</sup>. HMGB1 se libera a partir de células necróticas, pero también puede secretarse mediante macrófagos activados<sup>25</sup> y células NK activadas<sup>20</sup> en respuesta a estímulos inflamatorios, y es uno de los principales prototipos de las moléculas de patrón molecular asociados al daño (DAMP)<sup>26</sup>. Recientemente se descubrió que es una citocina crucial en el sistema inmunitario, que facilita el tráfico de leucocitos inflamatorios y es crítica para que las DC maduren, alcancen los ganglios linfáticos y mantengan la proliferación de células T específicas de antígeno, y que fomentaba su polarización hacia un fenotipo de células T cooperadoras<sup>127,28</sup>.

Los mecanismos implicados en la interacción NK-DC durante infecciones virales no se entienden muy bien. Recientemente se notificó en infección por CMV murino (MCMV) que DC infectadas por MCMV podían activar células NK singénicas *in vitro* y también podían potenciar el aclaramiento dependiente de células NK *in vivo*<sup>29</sup>, demostrando el papel crucial de la intercomunicación de NK-DC en el control de la replicación viral. En la infección por VIH, se encontró que la interacción NK-DC era defectuosa en pacientes virémicos infectados por VIH-1, pero no en los avirémicos, caracterizada por anomalías en el proceso de activación y maduración de NK-DC recíprocas, así como un defecto en la eliminación mediante células NK de iDC<sup>30</sup>. Se evaluó el papel de la intercomunicación de NK-DC sobre la maduración, función y propensión a la replicación viral de iDC infectadas por VIH-1. Se descubrió que la maduración de DC infectadas por VIH-1 podía desencadenarse mediante células NK activadas, pero estaba asociada con una fuerte insuficiencia de DC infectadas maduras para inducir la polarización de Th1 tras su intercomunicación con células NK. Además, la intercomunicación entre células NK e iDC infectadas por VIH-1 dio como resultado un drástico aumento en la replicación viral y la expresión de ADN proviral en DC. Este proceso se desencadenó principalmente por HMGB1, liberada tanto por células NK como DC, como consecuencia de intercomunicación de NK-DC.

El VIH-1 ha evolucionado las formas de aprovecharse de las DC, facilitando así la diseminación viral y permitiendo evadirse de la inmunidad antiviral. El destino de las DC depende de células NK. A continuación, los inventores detallan el impacto de la intercomunicación de NK-DC sobre el destino de DC infectadas por VIH-1. Las células NK activadas desencadenaron eficazmente la maduración de DC infectadas, pero esto estuvo asociado con una fuerte insuficiencia de DC maduras para inducir la polarización de Th1. Además, la intercomunicación entre células NK y DC infectadas dio como resultado un drástico aumento en la replicación viral y ADN de VIH en DC. HMGB1 fue

crucial en este proceso, y la inhibición de la actividad de HMGB1 mediante glicirricina o anticuerpos específicos suprimió la replicación de VIH-1 en DC. Los inventores describen cómo sus nuevos conocimientos sobre cómo el VIH "secuestra" las DC para fomentar eficazmente la diseminación viral pueden proporcionar nuevas maneras de inhibir la infección por VIH, nuevas maneras de diagnosticar y monitorizar la infección por VIH, nuevas maneras de monitorizar la infección por VIH, la carga viral y la eficacia del tratamiento dirigido frente a infección por VIH y nuevas maneras de llevar a cabo el pronóstico del estado de progresión de SIDA o hacia SIDA.

**Descripción de la invención**

Los aspectos de la invención incluyen las siguientes aplicaciones terapéuticas, de pronóstico y de diagnóstico.

El bloqueo de HMGB1 en pacientes puede ayudar a suprimir la replicación de VIH, reducir los reservorios de VIH en DC y ralentizar la progresión de la enfermedad. Por tanto, un aspecto de la invención implica un método para modular la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que comprende poner en contacto un sujeto infectado por VIH con un agente que se une a HMGB1, en particular un anticuerpo que se une a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) o un fragmento de anticuerpo de unión a HMGB1, glicirricina o el RAGE aislado o un fragmento de RAGE que puede unirse a HMGB1. La invención también se refiere a un agente que se une a HMGB1, en particular un anticuerpo que se une a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) o un fragmento de anticuerpo de unión a HMGB1, glicirricina o el RAGE aislado o un fragmento de RAGE que puede unirse a HMGB1, para su uso como fármaco para tratar la infección por VIH en un sujeto infectado por VIH. Un agente particular que puede usarse en terapia es un anticuerpo que bloquea específicamente HMGB1 o un fragmento de tal anticuerpo, en particular un fragmento de anticuerpo que conserva dicha capacidad para bloquear específicamente HMGB1. Ejemplos de fragmentos son un anticuerpo de cadena sencilla, o un fragmento Fab, Fv y Fab<sub>2</sub>. En una realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, o dicho fragmento es una parte de un anticuerpo monoclonal. En otra realización particular, dicho anticuerpo o fragmento es preferiblemente humano o humanizado. Por "que bloquea específicamente", quiere decirse que el anticuerpo o fragmento del mismo tiene la capacidad para unirse a la proteína HMGB1 y previene o disminuye su actividad, en particular para prevenir su unión en al menos uno de sus receptores, en particular el receptor RAGE. En una realización particular, la aparición del comportamiento de bloqueo de los anticuerpos de la invención o sus fragmentos puede someterse a prueba o bien sometiendo a ensayo la unión de HMGB1 en al menos uno de sus receptores, y/o bien sometiendo a ensayo la actividad de HMGB1 sobre la maduración de células dendríticas (DC) (tanto si están infectadas por VIH como si no), sobre la replicación de VIH en DC y/o sobre la expresión de ADN de VIH en DC. Se considera que un anticuerpo o fragmento del mismo bloquea específicamente la proteína HMGB1, cuando la disminución de la unión de HMGB1 en uno de sus receptores (en particular RAGE) o la disminución de la actividad de HMGB1 tal como se definió anteriormente es de más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80% o más del 90%.

En el contexto de la invención, el término "específicamente" o "específico" significa que los anticuerpos o sus fragmentos pueden reconocer y unirse a la proteína HMGB1, preferiblemente a otras proteínas celulares y en particular no reconocen ni se unen significativamente a otras proteínas celulares implicadas en el sistema inmunitario, en particular en el contexto de la intercomunicación de NK-DC o no reconocen ni se unen significativamente a otras proteínas celulares. En la presente solicitud, a menos que se mencione lo contrario, la descripción referente a anticuerpos se aplica a sus fragmentos tal como se dieron a conocer anteriormente.

Sin desear limitarse a ningún mecanismo de acción particular, este método puede funcionar reduciendo la replicación viral y el reabastecimiento de reservorios virales en células dendríticas. Por tanto, la invención también se refiere a un agente que se une a HMGB1 tal como se mencionó anteriormente para su uso como fármaco para disminuir las células de reservorio de VIH, en un sujeto infectado por VIH. Las células de reservorio de VIH pueden ser cualquier célula que es sensible al VIH y/o puede infectarse por el VIH. En una realización particular, las células de reservorio de VIH albergan el ADN proviral. Las células de reservorio de VIH se originan a partir de tejidos biológicos tales como sangre, tejidos sólidos o mucosa, y en particular de cerebro, hígado, bazo, amígdalas, ganglios o tejido linfoide asociado al intestino (GALT). En una realización particular, estas células son células de sangre periférica, células de linaje linfoide tales como células T especialmente células T CD4, o son células derivadas de monocitos tales como macrófagos o células dendríticas.

El virus de la inmunodeficiencia humana incluye las cepas tanto VIH-1 como VIH-2 así como otras variantes de este virus, incluyendo cepas de VIH adaptadas a simios y otros mamíferos.

La invención también se aplica al tratamiento, diagnóstico y monitorización de infecciones provocadas por otros retrovirus, incluyendo VIH-2 y virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS). Los sujetos o pacientes infectados por retrovirus tales como VIH incluyen seres humanos, monos y otros simios, y otros mamíferos usados como modelos de infección por VIH. Las cepas de VIH-1 específicas incluyen la cepa de VIH-1 R5 y la cepa de VIH-1 X4.

HMGB1 es una proteína bien conocida que aparece en el núcleo y también se sabe que es una citocina. Las características físicas y funcionales de HMGB1 se dan a conocer por Lotze, *et al.*, Nature Reviews, Immunology 5:351 (2005).

Se conocen anticuerpos que se unen a HMGB1 y pueden producirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de anticuerpos anti-HMGB1 comercialmente disponibles son anticuerpos policlonales primarios de conejo contra HMGB1 humana (Abcam ref. 18256) que se dirigen frente a un péptido sintético conjugado con KLH derivado de los residuos 150 al extremo C-terminal de HMGB1 humana. Estos métodos incluyen aquellos que producen anticuerpos policlonales frente a HMGB1 y anticuerpos monoclonales frente a HMGB1 o frente a fragmentos específicos de HMGB1. Los anticuerpos usados en aplicaciones terapéuticas tienen la característica de ser bloqueantes, por ejemplo, especialmente interfieren con la replicación de VIH inducida por HMGB1 en células dendríticas infectadas. Estos anticuerpos se derivan preferiblemente de la misma especie que el sujeto al que se administran y reconocen o se inducen hacia la HMGB1 de la misma especie a la que se administrarán. Estos anticuerpos pueden tener diferentes isotipos, tales como isotipos IgA, IgG o IgM. También pueden emplearse fragmentos de anticuerpo que se unen a HMGB1, incluyendo Fab, Fab<sub>2</sub>, y anticuerpos de cadena sencilla o sus fragmentos.

También pueden emplearse terapéuticamente anticuerpos monoclonales anti-HMGB1 humanizados en seres humanos. Estos pueden producirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. La inyección de estos anticuerpos en pacientes infectados por VIH con alta carga viral y niveles elevados de HMGB1 puede usarse para reducir la replicación del virus y limitar el número de células de reservorio. Tales anticuerpos humanizados pueden usarse como terapia de rescate o alternativa, o en combinación con agentes antirretrovirales.

Pueden administrarse anticuerpos o sus fragmentos tal como se definen en el presente documento que se unen a HMGB1 a un sujeto para unirse a HMGB1 y modular la replicación de o infección por VIH en el sujeto. Los modos de administración incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa (i.v.), intradérmica, subcutánea (s.c.), intracerebral, transmucosa, transdérmica, mediante inhalación (por ejemplo, intratraqueal, intrapulmonar o intrabronquial), intransal, oral, bucal, transdérmica y rectal.

Puede emplearse seleccionar como diana de la producción o liberación de HMGB1, o prevenir su interacción con su(s) receptor(s), en particular RAGE en DC, para tratar infecciones virales crónicas, teniendo en cuenta su impacto sobre la respuesta inflamatoria y la maduración y supervivencia de DC infectadas. Por tanto, puede emplearse agentes, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, que se unen a receptor de HMGB1 (por ejemplo RAGE) e inhiben su interacción con HMGB1 o proteínas de receptor de HMGB1 solubles (por ejemplo proteínas de RAGE solubles o fragmento que puede unirse a HMGB1) que inhiben la interacción funcional del receptor de HMGB1 (por ejemplo RAGE) en DC y HMGB1. También se contemplan partes de HMGB1 que se unen a RAGE en DC e inhiben la interacción funcional de HMGB1 con DC.

Los inventores han mostrado que la glicirricina puede inhibir la replicación de VIH dependiente de HMGB1 en DC. La terapia con glicirricina tiene pocos efectos secundarios y se ha usado recientemente de manera satisfactoria *in vivo* para prevenir la carcinogénesis hepatocelular en pacientes con hepatitis C crónica activa resistente a IFN. Esta terapia puede usarse en pacientes con infección crónica por VIH con carga viral detectable y niveles aumentados de HMGB1, o bien como terapia de rescate debido a virus con resistencia a múltiples fármacos, como terapia alternativa (menos tóxica y que actúa sobre el microentorno inflamatorio en lugar del propio virus) al uso de agentes antirretrovirales específicos de VIH, o una terapia combinada con agentes antirretrovirales en caso de éxito incompleto de estos fármacos.

En el presente documento se da a conocer un método para modular la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), incluyendo infección por VIH-1, que comprende poner en contacto una célula o un sujeto infectado por VIH con una cantidad de un agente que se une a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1), en particular que inhibe el desencadenamiento dependiente de linfocitos citolíticos naturales (NK) de la replicación de VIH en una célula dendrítica (DC). La solicitud también da a conocer un agente que se une a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1), en particular que inhibe el desencadenamiento dependiente de linfocitos citolíticos naturales (NK) de la replicación de VIH en una célula dendrítica (DC), para su uso en la modulación de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (incluyendo infección por VIH-1) en una célula o un paciente infectado por VIH.

La glicirricina es un agente de este tipo y se dan a conocer modos y concentraciones de glicirricina útiles para proporcionar unión a HMGB1 en Mollica, *et al.*, Chem. Biol. 14:431 (2007). También pueden emplearse otros agentes o compuestos, además de glicirricina, que se unen a HMGB1. Pueden emplearse ligandos solubles o segmentos de ligandos naturales a los que se une HMGB1. Tales ligandos pueden obtenerse a partir de leucocitos o células presentadoras de antígeno a los que se une HMGB1.

Pueden tratarse pacientes humanos infectados por, o con riesgo de infección por, VIH con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otros agentes de unión a HMGB1 dados a conocer en el presente documento con el fin de mantener el sistema inmunitario de los pacientes, incluyendo con un anticuerpo que bloquea específicamente HMGB1 o un fragmento que conserva dicha capacidad para bloquear específicamente HMGB1. Dado que la glicirricina no es tóxica mientras que muchos fármacos antirretrovirales provocan toxicidad sustancial, los tratamientos de la invención pueden reducir los efectos secundarios perjudiciales de la terapia anti-VIH convencional. Los productos basados en anticuerpos que reconocen HMGB1 también carecen de la toxicidad de

muchos fármacos anti-VIH y también pueden emplearse para reducir los efectos secundarios del tratamiento para VIH. De manera similar, el tratamiento avanzado de pacientes humanos que son resistentes, o han desarrollado múltiples resistencias a tratamientos con fármacos retrovirales convencionales, puede tratarse con los métodos de la invención, incluyendo productos de anticuerpos y otros agentes que se unen a HMGB1. También se contempla la terapia de combinación con glicirricina (o anticuerpos anti-HMGB1 bloqueantes humanizados) y fármacos antirretrovirales a dosis inferiores a cuando se usan solos.

Estos compuestos o agentes de unión a HMGB1 pueden usarse solos o en combinación con al menos un compuesto activo adicional frente a infección por VIH, o administrarse en combinación con otros agentes, tales como fármacos y agentes farmacéuticos, usados para tratar la infección por VIH. Los ejemplos de tales fármacos y agentes farmacéuticos incluyen dos inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NARTI o NRTI), inhibidores de proteasa e inhibidores de transcriptasa inversa distintos de nucleósidos (NNRTI), incluyendo AZT e indinavir.

La solicitud también da a conocer composiciones estériles, adecuadas para su administración a sujetos humanos, que comprenden un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), otros agentes de unión a HMGB1 y/o glicirricina; y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden contener otros fármacos o agente farmacéutico distinto de dicho anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o glicirricina, usados para tratar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana, tal como los mencionados anteriormente. De manera general, los anticuerpos usados como herramienta terapéutica para pacientes humanos infectados por VIH deben ser anticuerpos humanos o humanizados que bloquean la actividad de HMGB1.

Otros aspectos de la invención incluyen glicirricina para su uso como fármaco para tratar la infección por VIH en seres humanos, el uso de glicirricina para la fabricación de un medicamento para aplicación terapéutica en infecciones por VIH, y el uso de un anticuerpo específico para HMGB1 bloqueante humanizado aislado o fragmento de anticuerpo para la fabricación de un medicamento para la aplicación terapéutica en infecciones por VIH.

La invención también se refiere a un método *in vitro* para cuantificar anticuerpos totales específicos para HMGB1 contenidos en una muestra biológica obtenida de un sujeto, que comprende (a) tratar la muestra mediante un tratamiento ácido para disociar los complejos inmunitarios que implican HMGB1 encontrados en la muestra, preferiblemente con glicina 1,5 M a un pH bajo; (b) poner en contacto dicha muestra biológica tratada con proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma; y (c) cuantificar los anticuerpos totales específicos para HMGB1.

En una realización preferida, el tratamiento ácido consiste en poner en contacto la muestra con una disolución de disociación ácida, que tiene un pH bajo, preferiblemente de entre pH 1 y 3, elegido para separar la proteína HMGB1 de anticuerpos a los que se une inmunológicamente en la muestra, sin alterar la capacidad de unión de este anticuerpo. En una realización particular, la disolución de disociación ácida es glicina (por ejemplo 1,5 M) a un pH bajo, preferiblemente de entre pH 1 y 3 (por ejemplo de 1,85). Después se detiene el tratamiento ácido con un tampón de neutralización (tal como Tris, por ejemplo Tris 1,5 M, pH 9). En otra realización preferida, en combinación con la anterior o no, la incubación con la disolución de disociación ácida se lleva a cabo a una temperatura de entre 20 y 37°C, preferiblemente a 25°C, y/o la etapa de neutralización tiene lugar en hielo.

En la presente solicitud, el término "cuantificar" abarca el término "determinar cuantitativamente" y cualquier determinación informativa de la proteína HMGB1 o anticuerpos específicos.

La invención también se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la infección por VIH, en una muestra biológica obtenida de un sujeto que se sabe que está infectado por VIH, que comprende cuantificar los anticuerpos específicos para la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) contenidos en una muestra biológica obtenida de este paciente, en el que los anticuerpos seleccionados como diana para la cuantificación son o bien los anticuerpos totales específicos para HMGB1 o bien su fracción circulante (anticuerpos circulantes) o bien su fracción complejada inmunológica.

Los métodos para monitorizar la infección por VIH, la carga viral o la eficacia de un tratamiento y el método de pronóstico dados a conocer en el presente documento, pueden implementarse basándose o bien en la cuantificación de los anticuerpos circulantes específicos para HMGB1 (residuales), o bien en la cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1 o bien en la cuantificación de la fracción de complejo inmunológico de HMGB1/anticuerpos específicos.

En una realización particular, todos estos métodos se basan o bien en la cuantificación de anticuerpos específicos circulantes o bien en anticuerpos específicos totales.

La cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1 puede preferirse cuando el nivel de anticuerpos circulantes específicos para HMGB1 es bajo.

Quando la cuantificación se basa en los anticuerpos totales específicos para HMGB1, los métodos de la invención también comprenden una etapa adecuada para la disociación de complejos inmunológicos formados con anticuerpos específicos para HMGB1, y por ejemplo los métodos de la invención usan o incluyen el método de cuantificación basado en el tratamiento ácido tal como se dio a conocer anteriormente y se ilustra en los ejemplos.

En una realización particular, dicha cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra biológica (obtenida de un sujeto) con la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) o derivados de la misma. El contacto de la muestra con dicho anticuerpo así como la cuantificación del complejo formado se llevan a cabo *in vitro*.

La solicitud también da a conocer un método para monitorizar la carga viral de VIH en una muestra biológica obtenida de un sujeto, que se sabe que está infectado por VIH, que comprende llevar a cabo el método de cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1 o el método de monitorización basado en los anticuerpos específicos para HMGB1 mencionados en el presente documento, en el que cuantos más anticuerpos específicos para HMGB1 hay, menor es la carga viral.

Por "carga viral", quiere decirse o bien el ARN de VIH (que se deriva de partículas virales y está presente en el plasma) o bien el ADN de VIH (que se integra en el genoma celular y está presente en las células). En una realización particular, los métodos de la invención basados en la cuantificación de anticuerpos específicos para HMGB1 son adecuados para monitorizar la carga viral de ARN de VIH.

Se entiende que para el método de cuantificación, y los métodos de monitorización de la infección por VIH o de la eficacia de un tratamiento y el método de pronóstico de la invención y el método de monitorización de la carga viral de VIH dados a conocer en el presente documento, es posible usar la secuencia de la proteína HMGB1 de longitud completa (origen de mamífero, preferiblemente origen humano) o cualquier péptido (de 10 a 30 residuos de aminoácidos) o polipéptido (de 30 a 215 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 30 a 50, o de 30 a 100, o de 30 a 150 residuos) derivado de HMGB1 (derivados de la proteína HMGB1) siempre que esos derivados se unan a anticuerpos específicos para HMGB1 y/o permitan cuantificar los anticuerpos anti-HGB1. Tales derivados se seleccionan del grupo que consiste en una HMGB1 recombinante (por ejemplo de HMG biotech, HM-115), una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1, una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1 cuya secuencia es común para proteínas HMGB1 de diversos orígenes. Un ejemplo de este tipo es la BOXB recombinante de HMGB1 correspondiente a la secuencia común para HMGB1 humana y de ratón (HMGbiotech HM-051).

Estos métodos se llevan a cabo con una muestra biológica obtenida de un sujeto infectado por VIH, tal como sangre, plasma, suero, saliva, o cualquier tejido o líquido corporal.

Por "monitorizar la infección por VIH", quiere decirse la comparación de la progresión de la infección por VIH, es decir la disminución, el aumento o la estabilidad, en comparación con un ensayo anterior. La progresión de la infección por VIH refleja la de VIH y/o la integración del genoma de VIH en el genoma de células diana.

La invención también se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la eficacia de un tratamiento dirigido frente a infección por VIH, en un sujeto infectado por VIH, que comprende llevar a cabo el método de cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1 o el método de monitorización basado en los anticuerpos específicos para HMGB1 mencionados en el presente documento, en muestras obtenidas de dicho sujeto en diferentes momentos durante el tratamiento, y determinar la eficacia del tratamiento administrado al sujeto.

En este método de la invención, la cantidad de anticuerpos específicos para HMGB1 en un paciente infectado por VIH puede compararse con la cantidad de anticuerpos específicos para HMGB1 en un paciente no infectado (es decir no infectado por VIH).

Además, la cantidad de anticuerpos específicos para HMGB1 puede compararse con la cantidad obtenida a partir del mismo sujeto en un momento diferente, tal como antes de la infección, durante la infección primaria, aguda o crónica, o antes del inicio del tratamiento, por ejemplo antes del tratamiento y cada mes durante el tratamiento.

La administración de sustancia(s) está proporcionando "tratamiento" según la invención, o bien cuando se disminuye la cantidad de anticuerpos totales específicos para HMGB1, preferiblemente en un factor de al menos 1,5, en el M6 (6 meses tras el inicio del tratamiento) o en un factor de al menos 2 o al menos 3 en el M12, en comparación con la cantidad de anticuerpos totales específicos para HMGB1 en el mismo paciente antes del tratamiento. El término "tratamiento" se refiere de manera más general a cualquier medio usado para reducir la infección por VIH, es decir, el ARN de VIH y/o el ADN de VIH. El tratamiento según la invención abarca recurrir a tratamientos convencionales usando fármacos antirretrovirales tales como inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósidos/nucleótidos (NRTI), inhibidores de transcriptasa inversa distintos de nucleósidos (NNRTI), inhibidores de proteasa (PI), inhibidores de fusión o entrada, inhibidores de integrasa o cualquier combinación de los mismos.

La invención también se refiere a un método de pronóstico *in vitro* de o bien el estado de progresión del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o bien el estado de progresión hacia SIDA, en un paciente infectado por VIH,

que comprende llevar a cabo el método de cuantificación o el método para monitorizar la infección por VIH dados a conocer anteriormente en una muestra obtenida de un paciente tras la infección, y preferiblemente durante la infección primaria o aguda, o durante la infección crónica, y en el que cuanto mayor es el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1, mayor es el riesgo de desarrollar SIDA o un estado avanzado de SIDA.

El término "pronóstico" se refiere a la posibilidad de evaluar, en el momento en el que se lleva a cabo la cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1 a partir de una muestra obtenida de un paciente, el riesgo de que el paciente desarrolle SIDA o progrese hacia SIDA. La expresión "estado de progresión" se refiere a los diversos estadios que se encuentran en la progresión de SIDA o hacia SIDA, y en particular se refiere al sistema de estadificación de la enfermedad para la infección y enfermedad por VIH de la OMS producido y actualizado por la Organización Mundial de la Salud, que se resume a continuación en el presente documento. Estadio I: la enfermedad por VIH es asintomática y no se clasifica como SIDA; el estadio II incluye manifestaciones mucocutáneas menores e infecciones recurrentes de las vías respiratorias superiores; el estadio III incluye diarrea crónica no explicada durante más de un mes, infecciones bacterianas intensas y tuberculosis pulmonar; y el estadio IV incluye toxoplasmosis del cerebro, candidiasis del esófago, tráquea, bronquios o pulmones y sarcoma de Kaposi.

Cualquiera de los métodos *in vitro* dados a conocer anteriormente que implican la cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 puede llevarse a cabo implementando ELISA, u otros métodos de detección inmunológicos, usando la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) o derivados de la misma recubiertos sobre un soporte sólido, y opcionalmente usando anticuerpos secundarios que pueden detectar los anticuerpos específicos para HMGB1.

Basándose en los resultados mostrados a continuación, los inventores han encontrado que HMGB1 desencadena la replicación de VIH *in vivo* en pacientes infectados por VIH-1. Por consiguiente, aún otro aspecto de la invención implica la detección de una concentración aumentada de HMGB1 en muestras biológicas, tales como sueros, de sujetos infectados por VIH. También puede usarse una correlación positiva entre la carga viral y la concentración HMGB1 para monitorizar la infección por VIH. Pueden correlacionarse niveles de HMGB1 aumentados con progresión de la enfermedad o asociarse con un pronóstico peor. La concentración de HMGB1 en muestras biológicas puede cuantificarse con pruebas de diagnóstico bien conocidas, tales como pruebas ELISA. Hay hHMGB1 recombinante, AcM anti-hHMGB1 y suero de conejo anti-hHMGB1 comercialmente disponibles y pueden usarse en tales pruebas de diagnóstico. Se usa una prueba de este tipo para cuantificar la concentración de HMGB1 en muestras de pacientes, para identificar HMGB1 como marcador de pronóstico de la progresión de la infección por VIH y para monitorizar el efecto *in vivo* de anticuerpos anti-HMGB1 humanizados.

La invención también se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la infección por VIH en un sujeto infectado por VIH que comprende cuantificar la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) contenida en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, en particular poniendo en contacto la muestra biológica de dicho sujeto infectado por VIH, con anticuerpos que se unen inmunológicamente a la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), en el que la proteína HMGB1 seleccionada como diana para la cuantificación es la proteína HMGB1 total o su fracción complejada inmunológica.

Los métodos para monitorizar la infección por VIH, la carga viral o la eficacia de un tratamiento y el método de pronóstico dados a conocer en el presente documento, pueden implementarse basándose en la cuantificación de la HMGB1 circulante (residual), basándose en la cuantificación de la HMGB1 total o basándose en la cuantificación de la fracción de complejo inmunológico de HMGB1/anticuerpos específicos.

Todos estos métodos se basan en la cuantificación o bien de HMGB1 circulante o bien de HMGB1 total. La cuantificación de la HMGB1 total puede preferirse cuando el nivel de HMGB1 circulante es bajo. Cuando la cuantificación se basa en la HMGB1 total, los métodos de la invención también comprenden una etapa adecuada para la disociación de complejos inmunológicos formados con anticuerpos específicos para HMGB1, y por ejemplo los métodos de la invención usan o incluyen un tratamiento ácido de la muestra.

Un tratamiento ácido adecuado comprende poner en contacto la muestra con una disolución de disociación ácida, que tiene un pH bajo, preferiblemente de entre pH 1 y 3, elegido para separar la proteína HMGB1 del anticuerpo específico sin alterar la proteína HMGB1 y su capacidad de reconocimiento por anticuerpos específicos. En una realización particular, la disolución de disociación ácida es glicina (por ejemplo 1,5 M) a un pH bajo, preferiblemente de entre pH 1 y 3 (por ejemplo de 1,85). Después se detiene el tratamiento ácido con un tampón de neutralización (tal como Tris, por ejemplo Tris 1,5 M, pH 9). En otra realización preferida, en combinación con la anterior o no, la incubación con la disolución de disociación ácida se lleva a cabo a una temperatura de entre 20 y 37°C, preferiblemente a 25°C, y/o la etapa de neutralización tiene lugar en hielo.

La cuantificación de la proteína HMGB1 puede compararse con la cantidad de HMGB1 a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto no infectado por VIH, o con la cantidad de HMGB1 a partir de una muestra biológica obtenida del mismo sujeto en un momento diferente.

La invención también se refiere a un método para monitorizar la carga viral de VIH en una muestra biológica obtenida de un sujeto, que se sabe que está infectado por VIH, que comprende llevar a cabo la cuantificación de la proteína HMGB1, en el que cuanto más proteína HMGB1 hay, mayor es la carga viral. Por "carga viral", quiere decirse o bien el ARN de VIH (que se deriva de partículas virales y está presente en el plasma) o bien el ADN de VIH (que se integra en el genoma celular y está presente en las células). En una realización particular, los métodos de la invención basados en la cuantificación de HMGB1 son adecuados para monitorizar la carga viral de ARN de VIH.

La invención también se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la eficacia de un tratamiento dirigido frente a infección por VIH en un sujeto infectado por VIH, que comprende llevar a cabo el método de monitorización de la infección por VIH basado en la proteína HMGB1 dado a conocer anteriormente, en muestras obtenidas de dicho sujeto en diferentes momentos durante el tratamiento, y determinar la eficacia del tratamiento administrado al sujeto, y opcionalmente comparar estos resultados obtenidos en una muestra del mismo sujeto antes del inicio del tratamiento. La administración de sustancia(s) está proporcionando "tratamiento" según la invención o bien cuando se disminuye la cantidad de proteína HMGB1 celular o bien, preferiblemente, en un factor de al menos 1,5 en el M1 (1 mes tras el inicio del tratamiento) o bien en un factor de al menos 2 en el M3, en comparación con la cantidad de HMGB1 en el mismo paciente antes del tratamiento, o bien cuando se alcanza el valor obtenido en muestras de donantes sanos (menos de 500 pg/ml). También puede considerarse que un tratamiento es eficaz cuando la cantidad de proteína HMGB1 total alcanza el valor obtenido en muestras de donantes sanos. El término "tratamiento" se refiere de manera más general a cualquier medio usado para reducir la infección por VIH, es decir, el ARN de VIH y/o el ADN de VIH.

La invención también se refiere a un método de pronóstico *in vitro* de o bien el estado de progresión del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o bien el estado de progresión hacia SIDA, en un paciente infectado por VIH, que comprende cuantificar HMGB1 mediante cualquier método dado a conocer anteriormente, en una muestra obtenida de un paciente tras la infección, y preferiblemente durante la infección primaria o aguda, o durante la infección crónica y en el que cuanto mayor es el nivel de HMGB1 total, mayor es el riesgo de desarrollar SIDA o un estado avanzado de SIDA. Las definiciones facilitadas anteriormente, referentes al método de pronóstico basado en los anticuerpos específicos para la proteína HMGB1, también se aplican en este caso.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para cuantificar los anticuerpos totales específicos para la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) en una muestra, que comprende: a) proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma tal como se definieron anteriormente, y b) una disolución de disociación ácida adecuada para disociar complejos inmunológicos de HMGB1/anticuerpo anti-HMGB1 encontrados en la muestra cuando se toma del paciente, tal como se definió anteriormente.

La invención también se refiere a un kit para cuantificar la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) total en una muestra, que comprende a) un anticuerpo específico para la proteína HMGB1, o un fragmento del mismo que puede unirse a la proteína HMGB1, tal como se definió anteriormente y b) una disolución de disociación ácida adecuada para disociar complejos inmunológicos de HMGB1/anticuerpo anti-HMGB1 encontrados en la muestra cuando se toma del paciente, tal como se definió anteriormente. Opcionalmente, estos kits también pueden contener un tampón de neutralización, por ejemplo tal como se definió anteriormente y/o anticuerpos secundarios que se unen a y/o revelan la formación del complejo de HMGB1/anticuerpos específicos.

Por tanto, la solicitud también da a conocer el diagnóstico, incluyendo el diagnóstico diferencial, de infección por virus de la inmunodeficiencia (VIH) o la evaluación del riesgo de infección por VIH en un sujeto. Este método de diagnóstico implica poner en contacto una muestra biológica, tal como sangre, plasma, suero, saliva u otros líquidos corporales, obtenida de un sujeto que se sospecha que tiene infección por VIH con un anticuerpo que se une inmunológicamente a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) y detectar la formación de complejo entre cualquier HMGB1 en dicha muestra y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a HMGB1. El contacto de la muestra con dicho anticuerpo así como la detección del complejo formado se llevan a cabo *in vitro*. El diagnóstico o una indicación del riesgo de tener infección por VIH puede determinarse basándose en la formación aumentada de complejos de anticuerpo-HMGB1 en comparación con la formación de complejos en un sujeto de control no infectado por VIH, o en comparación con la formación de complejos en dicho sujeto antes de la infección por VIH, tal como infección por VIH-1. Un ejemplo de un método de diagnóstico de este tipo es el uso de ELISA para detectar proteína HMGB1 usando un anticuerpo monoclonal recubierto sobre un soporte sólido y anticuerpo policlonal para detectar HMGB1 unida al AcM recubierto.

También pueden realizarse otras pruebas de diagnósticos para descartar o controlar la inflamación aguda y/o crónica en dicho sujeto o para indicar la presencia o el título de VIH en un sujeto de prueba como parte del procedimiento de diagnóstico global de sujetos humanos o no humanos.

De manera similar, un sujeto que se sabe que está infectado por VIH o anteriormente infectado por VIH puede monitorizarse mediante puesta en contacto de una muestra biológica del sujeto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) y cuantificación de la formación de complejos entre HMGB1 en dicha muestra y dicho anticuerpo. El contacto de la muestra con dicho anticuerpo así



como la cuantificación del complejo formado se llevan a cabo *in vitro*. En este caso, la cantidad de complejos es indicativa del grado de desencadenamiento dependiente de NK de la replicación de VIH en dicho sujeto y por tanto una medida de la intensidad o progresión de la infección por VIH. La formación de complejos puede compararse con la cantidad de formación de complejos con la formación de complejos en una muestra biológica obtenida de un sujeto no infectado por VIH o con la formación de complejos obtenida del mismo sujeto en un momento diferente, tal como antes de la infección o durante una infección aguda o crónica anterior. Este método también puede implicar otras pruebas de diagnóstico para descartar o controlar la inflamación aguda y/o crónica atribuible a HMGB1 no asociada con infección por VIH en el sujeto y puede ir acompañado por otras pruebas de diagnóstico para determinar la presencia o carga viral de VIH en el sujeto.

Antes de la realización de un ensayo de diagnóstico tal como se da a conocer en el presente documento, la muestra biológica, tal como suero o plasma, puede tratarse con ácido para separar HMGB1 de otras proteínas que se unen a HMGB1, véase Gaillard, *et al.*, PLOS One 3(8) e2855, páginas 1-9 (2008) ya que enseña métodos de alta sensibilidad para la detección y medición de proteína HMGB1, incluyendo tratamiento ácido. Tal tratamiento aumenta el número de epítomos de HMGB1 disponibles para su reconocimiento por anticuerpos. El tratamiento ácido es opcional, ya que algunos anticuerpos frente a HMGB1 se unen a regiones de la proteína no bloqueadas por la unión de otras proteínas.

No se necesita que los anticuerpos usados para aplicaciones de diagnóstico bloqueen la actividad de HMGB1 y pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos de anticuerpo que se unen a HMGB1. Tales anticuerpos pueden derivarse mediante métodos conocidos a partir de animales tales como ratones, ratas y conejos o producirse mediante otros métodos bien conocidos en la técnica. Pueden formularse anticuerpos u otros agentes de unión a HMGB1 usados para el diagnóstico o la monitorización de niveles de HMGB1 para obtener kits que incluyen instrucciones escritas o electrónicas referentes a cómo realizar el ensayo, tampones, conservantes, muestras de control negativo y/o de la posición, soportes sólidos y recipientes o materiales de acondicionamiento.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Las células aNK inducen la maduración de DC infectadas por VIH-1 inmaduras primarias. (a) Se cultivaron conjuntamente iDC, generadas a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> purificados en presencia de IL-4 y GM-CSF, durante 24 h con células aNK a diferentes razones. Se determinó la supervivencia de DC mediante citometría de flujo con el ensayo 7-AAD. Se identificaron DC supervivientes como células 7AAD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>. Los datos representan tres experimentos independientes y los valores son medias  $\pm$  de. (b) Las células aNK inducen la maduración de iDC. Análisis mediante citometría de flujo de iDC, que o bien se infectaron con R5-HIV-1BaL (1 ng/ml de p24) durante 3 h o bien no se infectaron, se incubaron con células rNK o aNK a una razón de 1:5. La tinción conjunta con anticuerpos específicos para HLA-DR y CD86 permitió la identificación de DC maduras (CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>). Se muestran los datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes. (c) Las condiciones de infección usadas en este estudio fueron aquellas de una infección productiva de iDC, tal como se muestra en el día 3 mediante una detección de p24 significativa en sobrenadante de cultivo de iDC infectadas y detección intracelular mediante citometría de flujo de p24 en DC seleccionadas como diana mediante expresión de CD40. Se realizaron experimentos con DC de tres donantes independientes, y los valores son medias  $\pm$  de. (d) La infección por VIH-1 no induce en sí misma la maduración de iDC, tal como se muestra mediante tinción doble con CD86/HLA-DR de iDC infectadas por p24 de VIH-1 de 0,001 a 10 ng/ml. Se muestra la proporción de mDC inducidas mediante LPS (DC0) (el 78,1% de CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>) como control positivo. (e) Se muestra la proporción de DC CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup> maduras inducidas en los cultivos conjuntos idénticos de iDC infectadas o no infectadas con células o bien rNK o bien aNK. Estos experimentos se realizaron con células primarias de varios donantes, y se muestran datos representativos de tres de ellos. Cuando se indica, se realizaron análisis estadísticos con la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. \*p<0,05, \*\* p = 0,02.

Figura 2. La intercomunicación de aNK-DC desencadena la expresión de HMGB1 tanto en células aNK como en DC. (a) Se sometieron a prueba sobrenadantes de cultivo libres de células de 24 h de iDC, células rNK, células aNK (10<sup>6</sup>/ml), o cultivos conjuntos de células aNK e iDC (razón 1:5) para determinar el contenido en citocina. Se usó tecnología de MAP para cuantificar IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ , mientras que HMGB1 se cuantificó mediante ELISA. \* p<0,05 (prueba de Mann-Whitney no paramétrica). (b) Se detectó expresión de HMGB1 mediante inmunofluorescencia (en rojo) en células NK de sangre recién clasificadas. La contratinción con DAPI (en azul) mostró la localización nuclear de HMGB1. (c) La incubación de células aNK con VIH-1 inhibe la secreción de HMGB1. Panel izquierdo: se incubaron células aNK (10<sup>6</sup> células/ml) en medio o con R5-HIV-1BaL (1 ng/ml de p24) durante 3 h y se sometieron a prueba para determinar la producción de HMGB1 21 h después. Los datos representan tres experimentos independientes y los valores son medias  $\pm$  de. Panel derecho: Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de HMGB1 en las mismas preparaciones de células aNK. (d) La producción de HMGB1 durante la intercomunicación de aNK-iDC no se ve inhibida mediante la infección por VIH-1 de iDC. Se incubaron iDC durante 3 h en medio o con HIV-1BaL (1 ng/ml de p24) y se sometieron adicionalmente a cultivo conjunto durante 21 h con células aNK (razón de aNK:iDC 1:5). Después se midió la concentración de HMGB1 en sobrenadantes de cultivo. Los datos representan la media  $\pm$  de de tres experimentos independientes. (e) Análisis mediante inmunofluorescencia confocal de la expresión de HMGB1 en iDC no infectadas o infectadas por VIH-1. Panel superior: iDC no infectadas; panel central: iDC infectadas por VIH-1 y en replicación, tal como se muestra

mediante tinción de p24 intracelular; panel inferior: iDC incubadas con VIH-1 pero negativas para la expresión de p24 intracelular. (f) Se generaron DC maduras mediante estimulación durante 48 h de iDC con LPS (DC0), CD40L soluble (DC1) o LPS+PGE2 (DC2). Se incubaron DC0, DC1 y DC2 durante 3 h en medio o se infectaron con R5-HIV-1BaL (1 ng/ml de p24) y se incubaron adicionalmente en medio durante 21 h. Se realizó la cuantificación de HMGB1 en sobrenadantes de cultivo. Se muestra la media  $\pm$  de de tres experimentos independientes. (g) Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de HMGB1 en conjugados de células aNK y DC no infectadas (panel superior) o infectadas por VIH-1 (panel inferior) en un cultivo conjunto durante 24 h. Las DC son DC-SIGN<sup>+</sup> y tanto las células aNK como las DC expresan HMGB1 en estos conjugados. Se muestran imágenes de un experimento representativo de tres realizados con diferentes preparaciones de células primarias.

Figura 3. La maduración dependiente de aNK de iDC infectadas por VIH-1 está mediada por HMGB1 e implica a RAGE. (a) Panel izquierdo: se cultivaron iDC durante 24 h o bien solas o bien con células aNK, en presencia de anticuerpos anti-HMGB1 bloqueantes (10  $\mu$ g/ml) o glicirricina (10  $\mu$ g/ml). Se determinó el estado de maduración de las DC mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos para CD86 y HLA-DR. Panel derecho: el mismo experimento, pero realizado con iDC infectadas por VIH-1. Los datos representan la media  $\pm$  de de al menos tres experimentos independientes, y se realizaron comparaciones estadísticas con la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. \*  $p < 0,05$ . (b) Se cultivaron iDC (10<sup>6</sup> células/ml) durante 48 h con concentraciones crecientes (1-10  $\mu$ g/ml) de rh-HMGB1. Después se tiñeron las células con anticuerpos anti-CD86, -HLA-DR, -CD80, -CD83, DC-LAMP y -CD40 y se analizaron mediante citometría de flujo. (c) Influencia de rh-HMGB1 sobre la producción de citocinas y quimiocinas (determinada mediante MAP) mediante DC. Se incubaron iDC (10<sup>6</sup> células/ml) durante 48 h en medio o en presencia de rh-HMGB1 (1 ó 10  $\mu$ g/ml). Como control positivo, se estimularon iDC con LPS (DC0). (d) Detección mediante citometría de flujo de la expresión en superficie de RAGE mediante iDC, DC0, o iDC incubadas con rh-HMGB1 (1  $\mu$ g/ml). O bien no se infectaron iDC o bien se infectaron con VIH-1 (p24 1 ng/ml durante 3 h). (e) iDC, DC0, iDC no infectadas o infectadas por VIH-1 cultivadas de manera conjunta durante 24 h con células aNK, se incubaron con rh-HMGB1 (1  $\mu$ g/ml) y posteriormente se tiñeron con anticuerpos anti-RAGE y se analizaron mediante citometría de flujo. Se excluyeron las células NK del análisis mediante la tinción conjunta con anticuerpos específicos para CD3 y CD56 (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

Figura 4. La insuficiencia de la polarización de Th1 desencadenada por NK mediante DC tras la infección por VIH-1 está asociada con una producción alterada de IL-12 e IL-18. (a) Se sometió a prueba la polarización de Th1 mediante DC desencadenada por células NK mediante incubación de iDC (10<sup>6</sup>/ml) durante 30 min en presencia de células rNK o aNK (2x10<sup>5</sup>/ml). Se añadieron células T CD4 no diferenciadas (10<sup>6</sup>/ml) a los cultivos conjuntos y se determinó la frecuencia de células T que producían IFN- $\gamma$  o IL-4 mediante citometría de flujo 8 días después. Se realizó el experimento o bien con iDC no infectadas (b) o bien con iDC infectadas por VIH-1 (c) o bien con iDC infectadas por VIH-1 en presencia de AZT (1 mM) (d). Se sometieron a prueba los sobrenadantes de cultivo de los cultivos indicados para determinar el contenido en IL-12 (e), IL-18 (f) e IFN-g (g). Los datos representan la media  $\pm$  de de cinco experimentos independientes. Se realizaron comparaciones estadísticas con la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p = 0,03$ .

Figuras 5 (a)-(f). Desencadenamiento dependiente de HMGB1 de la replicación de VIH en DC como consecuencia de la intercomunicación de NK-DC. (a) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión intracelular de p24 en iDC (CD40<sup>+</sup>) (10<sup>6</sup>/ml) infectadas por VIH-1 (panel inferior) o no infectadas (panel superior) tras una incubación durante 3 días, o bien solas o bien en presencia de células rNK o aNK (2x10<sup>5</sup>/ml). (b) Concentración de p24 en sobrenadantes de cultivo de los mismos cultivos. Media  $\pm$  de de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , prueba de Mann-Whitney no paramétrica. (c) Análisis mediante inmunofluorescencia de expresión de p24 intracelular en iDC infectadas por VIH-1 cultivadas durante 3 días o bien solas o bien en presencia de células aNK. Se tiñen los núcleos con DAPI. (d) Expresión de p24 intracelular mediante citometría de flujo en DC0 infectadas por VIH-1 (10<sup>6</sup>/ml) cultivadas o bien solas o bien en presencia de células aNK durante 6 días. (f y g) Concentración de p24 en sobrenadantes de cultivo de DC maduras infectadas por VIH-1 cultivadas o bien solas o bien en presencia de células rNK o aNK durante 6 días. Media  $\pm$  de de tres experimentos independientes. Se realizaron comparaciones estadísticas con la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. \*  $p < 0,05$ . (e) Niveles de ADN proviral de VIH-1, determinados mediante análisis del ciclo de luz con células de los cultivos indicados. Se muestra un experimento representativo de tres realizados con diferentes preparaciones de células primarias.

Figuras 6 (a), (b) y (c). rh-HMGB1 exógena desencadena la replicación de VIH-1 y VIH-2 en iDC. (a) Se cultivaron iDC infectadas por VIH-1 solas o en presencia de células aNK durante 3 días. Se añadió rh-HMGB1 (1  $\mu$ g/ml) en algunos cultivos. Se midió la replicación de VIH mediante cuantificación de p24 en sobrenadante de cultivo. (b) Se cultivaron iDC infectadas por VIH-1 solas o en presencia de células aNK durante 3 días. Se añadieron anticuerpos anti-HMGB1 bloqueantes (10  $\mu$ g/ml) o glicirricina (10  $\mu$ g/ml) al inicio del cultivo. Se midió la replicación de VIH mediante cuantificación de p24 en sobrenadante de cultivo. Se muestra la media  $\pm$  de de tres experimentos independientes. Se realizaron comparaciones estadísticas con la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. \*  $p < 0,05$ ; (c) Se cultivaron iDC infectadas por VIH-2 solas o en presencia de células aNK durante 3 días. Se añadió rh-HMGB1 (1  $\mu$ g/ml) en algunos cultivos. Se midió la replicación de VIH mediante cuantificación de p24 en sobrenadante de cultivo.

Figuras 7 (a)-(c). Las células NK activadas (aNK) inducen rápidamente apoptosis de células dendríticas inmaduras (iDC) a una razón de NK:DC de 5:1. (a) Se cultivaron conjuntamente iDC, generadas a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> purificados a partir de donantes sanos en presencia de IL-4 y GM-CSF, durante 24 h con células NK en reposo (rNK) o células aNK a dos razones de NK:DC diferentes (1:5 y 5:1). Se determinó la supervivencia de DC mediante citometría de flujo usando el ensayo 7-AAD. Se excluyeron las células NK del análisis separando la población CD56<sup>-</sup>. Las DC supervivientes son células 7-AAD<sup>-</sup>FSC<sup>high</sup>. Los datos representan tres experimentos independientes. (b) Videomicroscopía en directo de la apoptosis de iDC inducida por células aNK. Se muestran imágenes de un experimento representativo de tres realizados con diferentes preparaciones de células primarias. (c) Cinética de la destrucción de iDC mediante células aNK, evaluada mediante la proporción de DC supervivientes en cultivos conjuntos. Estos experimentos se realizaron con células primarias de varios donantes sanos, y se muestran datos representativos de tres de ellos.

Figuras 8(a)-(b). Las DC que son resistentes a la destrucción por células aNK muestran un fenotipo maduro. (a) Se cultivaron conjuntamente iDC, generadas a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> purificados en presencia de IL-4 y GM-CSF, durante 24 h con células aNK a la razón de NK:DC de 5:1. Se determinó la supervivencia de DC mediante citometría de flujo con el ensayo 7-AAD. Se excluyeron las células NK del análisis separando la población CD56<sup>-</sup>. Las DC supervivientes son células 7-AAD<sup>-</sup>FSC<sup>high</sup>. Además de la apoptosis, las células aNK indujeron la maduración de iDC. La tinción conjunta con anticuerpos específicos para HLA-DR y CD86 permitió la identificación de DC maduras (CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>). Como control positivo, se generaron DC maduras mediante estimulación durante 48 h de iDC con LPS (DC0). Se muestran datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes. (b) Se tiñeron iDC, cultivadas solas o cultivadas conjuntamente con células aNK a la razón de NK:DC de 5:1, con anticuerpos anti-CD83 y -DC-SIGN y se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión positiva de ambos marcadores demuestra el fenotipo maduro de iDC. Los datos representan uno de tres experimentos independientes.

Figuras 9(a)-(g). La apoptosis de iDC dependiente de aNK es dependiente de ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) e implica al receptor DR4. (a) Se purificaron células NK CD56<sup>+</sup> a partir de la sangre de donantes sanos. Se mantuvieron células NK en cultivo con concentraciones inferiores a la óptima de interleucina 2 (IL-2) (100 ng/ml) (células rNK) o activadas (células aNK) mediante la adición de PHA (10 µg/ml) e IL-2 (10 µg/ml) a cultivos. La intensidad de la tinción con anticuerpos anti-CD56 permite la distinción entre dos poblaciones de células NK que expresan CD56 altamente (células CD56<sup>bright</sup>) y débilmente (células CD56<sup>dim</sup>). Los datos representan la media ± de de tres experimentos independientes. (b) Se determina la expresión de TRAIL de membrana (mTRAIL) mediante células NK mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos anti-CD56 y -mTRAIL. Los datos representan uno de tres experimentos independientes. (c) Se tiñeron conjuntamente células aNK con anticuerpos anti-CD56 y -mTRAIL. Se determinaron las proporciones de células aNK que expresaban mTRAIL entre las poblaciones CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. Los datos representan la media ± de de tres experimentos independientes. (d) Detección de la expresión del receptor de TRAIL, DR4, sobre la superficie de iDC mediante citometría de flujo. En algunos casos, se cultivaron conjuntamente iDC con células aNK a la razón de NK:DC de 5:1. Se analiza la expresión de DR4 en la superficie de DC tras 1, 2, 3,5, 6 y 24 h de cultivo conjunto de NK-DC. Estos experimentos se realizaron con tres donantes, y se muestran datos representativos de uno de ellos. (e) Se cultivaron iDC (10<sup>6</sup> células/ml) durante 24 h con concentraciones crecientes (1-1000 ng/ml) de TRAIL soluble humano recombinante (rhs-TRAIL). Después se cuantificó la muerte celular con el ensayo 7-AAD. Los datos representan la media ± de de tres experimentos independientes. (f) Se sometieron a prueba sobrenadantes de cultivo libres de células de 24 h de iDC, células rNK, células aNK (10<sup>6</sup>/ml), o cultivos conjuntos de células aNK e iDC (razón 5:1) para determinar el contenido en TRAIL soluble (sTRAIL). Se cuantificó sTRAIL mediante ELISA. Los datos representan la media ± de de tres experimentos independientes. (g) Se cultivaron iDC durante 24 h o bien solas o bien con células aNK (razón de NK:DC de 5:1), en ausencia o presencia de anticuerpos anti-DR4 bloqueantes (250 ng/ml). Se determinó el estado de viabilidad de DC mediante citometría de flujo con el ensayo 7-AAD. Los datos representan uno de tres experimentos independientes.

Figuras 10(a)-(d). DC infectadas por R5 de VIH son resistentes a la destrucción por células aNK, aunque la secreción de TRAIL persiste en presencia de VIH-1. (a) O bien se infectaron iDC con R5-HIV-1<sub>BaL</sub> (1 ng/ml de p24) durante 24 h o bien no se infectaron, y tras varios lavados se incubaron con células aNK a las razones de 1:5 y 5:1. Se sometió a ensayo la viabilidad de iDC con la prueba 7-AAD mediante citometría de flujo. Las células vivas son 7-AAD<sup>-</sup>, las células apoptóticas son 7-AAD<sup>+</sup>, y los residuos apoptóticos son 7-AAD<sup>-</sup>FSC<sup>low</sup>. Los gráficos de puntos representan uno de al menos tres experimentos independientes. (b) R5 de VIH no induce la maduración de iDC. Se dejaron DC sin infectar (iDC), se infectaron con R5 de VIH-1 a 1 ng/ml de p24 (DC con VIH) o se estimularon con LPS durante 48 h. Después se tiñeron las células con CD86 y HLA-DR. Los datos representan uno de al menos tres experimentos independientes. (c) La secreción de TRAIL no se ve afectada por la infección por VIH de iDC. Se sometieron a prueba sobrenadantes de cultivo libres de células de 24 h de iDC, DC infectadas por VIH (10<sup>6</sup>/ml), cultivos conjuntos de células aNK-iDC (razón 5:1) y cultivos conjuntos de células aNK-DC infectadas por VIH (razón 5:1) para determinar el contenido en TRAIL soluble (sTRAIL) mediante ELISA. Los datos representan la media ± de de tres experimentos independientes. (d) Las DC infectadas por VIH-1 todavía son propensas a la apoptosis inducida por TRAIL. Se cultivaron iDC y DC infectadas por VIH (10<sup>6</sup> células/ml) durante 24 h con concentraciones crecientes (1-1000 ng/ml) de rhs-TRAIL. Después se cuantificó la muerte celular con el ensayo 7-AAD. Se presenta la media ± de de tres experimentos independientes.

Figuras 11(a)-(b). La caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) está implicada en la resistencia de iDC infectadas por VIH-1 frente a apoptosis de DC inducida por NK. (a) Se cultivaron iDC o iDC infectadas por VIH-1 solas o en presencia de células aNK (razón de NK:DC de 5:1). En algunos experimentos, se añadió azidotimidina (AZT) en el momento de la infección por VIH; en otros se añadió glicirricina (10 ng/ml) al inicio del cultivo conjunto. Después se cuantificó la muerte celular con el ensayo 7-AAD. (b) Se realizaron los mismos experimentos en presencia de anticuerpos anti-HMGB1 bloqueantes (10 y 15  $\mu$ g/ml). Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

Figuras 12(a)-(b): (a) Las células aNK inducen apoptosis de iDC no infectadas mediante regulación por incremento de la expresión de receptor de TRAIL (DR4) en la superficie de iDC, aumentando así la sensibilidad de DC a la apoptosis dependiente de TRAIL. (b) Las DC infectadas por VIH-1 son resistentes a la apoptosis inducida por aNK mediante un mecanismo dependiente de HMGB1. Por consiguiente, las células aNK participan en la persistencia de DC infectadas, transmisión de VIH dependiente de DC a células T CD4 y establecimiento de reservorios de VIH.

Figura 13. Determinación de las condiciones para el ensayo ELISA para anticuerpos anti-HMGB1 (A): Determinación de la concentración de BSA para saturar pocillos recubiertos con HMGB1. (B): Determinación de la concentración de anticuerpo anti-IgG-PAL (anticuerpo secundario) para revelar anticuerpos anti-HMGB1 unidos. (C): Determinación de la concentración de HMGB1 para recubrir los pocillos. (D): Determinación de la concentración de anticuerpo anti-HMGB1 purificado para la elaboración de la curva patrón. (E): Especificidad del ensayo.

Figura 14. Titulación de anticuerpos anti-HBG1 con recubrimiento de la proteína HMGB1 o de la BOXB.

Figura 15. Se titularon sueros humanos, o bien sin tratar o bien tratados con glicina 1,5 M, para determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-HMGB1. Los anticuerpos anti-HMGB1 circulantes (libres) se representan con rayas, mientras que los anticuerpos anti-HMGB1 complejados se representan en gris.

Figura 16. Titulación de concentración de HMGB1 en sueros de pacientes VIH+. Cada histograma representa un único paciente. La línea horizontal indica el nivel de detección mínimo mediante la prueba Elisa, las líneas discontinuas indican el nivel medio de HMGB1 en donantes sanos.

Figura 17. Impacto de HAART sobre subconjuntos de células T (A) y la carga viral de VIH (B) medido en diferentes momentos (en meses) tras HAART. \*\*\*:  $p < 0,001$  y \*\*:  $p < 0,05$ .

Figura 18. Titulación de HMGB1 en sueros de pacientes infectados por VIH que recibieron HAART en el M0. La concentración media de HMGB1 en donantes sanos se muestra mediante la línea discontinua.

Figura 19. Titulación de anticuerpos anti-HMGB1 en sueros de pacientes infectados por VIH, e impacto de la terapia antirretroviral. M-1 significa muestras de suero de pacientes sometidas a prueba de 15 a 30 días antes de la inclusión en el ensayo clínico. M1, M3, M6 y M12 indican en los diferentes puntos de tiempo tras HAART. "Fin" significa los pacientes que detuvieron HAART entre M9 y M12.

Figura 20. Estudio de correlación entre concentraciones en suero de HMGB1 y de anticuerpo anti-HMGB1 (A), y entre anticuerpos anti-HMGB1 y la carga viral de ARN de VIH (B). Prueba de correlación de Spearman. Se indican el coeficiente de correlación  $r$ , la probabilidad de correlación ( $p$ ) y el número de muestras analizadas ( $n$ ).

## Ejemplos

HMGB1 es una proteína nuclear que está presente en casi todas las células eucariotas, y funciona para estabilizar la formación de nucleosomas y actúa como proteína similar a factor de transcripción que regula la expresión de varios genes. También es una citocina, secretada mediante macrófagos activados, células dendríticas maduras (DC) y linfocitos citotóxicos naturales (NK) en respuesta a una lesión, infección u otros estímulos inflamatorios.

Los estadios iniciales de infecciones virales están asociados con un reclutamiento local y activación de efectores de la inmunidad innata, es decir células NK y DC. Las DC son esenciales tanto para la presentación de antígenos como para la activación de células T CD4<sup>+</sup> no diferenciadas, y además la polarización de Th I. Las DC también constituyen dianas iniciales para el VIH y contribuyen a la persistencia del VIH mediante integración de ADN proviral. La maduración de DC y la homeostasis se controlan mediante una intercomunicación entre DC y células NK. Anteriormente se desconocía la contribución de esta intercomunicación a la propensión de DC para la replicación de VIH.

Las células NK activadas (aNK) proporcionan una fuente de HMGB1, que se libera durante el contacto entre células NK y DC inmaduras (iDC) y fomenta la maduración de iDC y la inducción de respuestas de células T cooperadoras 1 dependientes de IL-12. Tras la infección de iDC con VIH-1, las DC ya no eran propensas a la polarización de IL-12 dependiente de NK, y por tanto ya no podían inducir una respuesta de Th1. Además, la maduración y supervivencia de DC dependientes de NK se asoció con una producción aumentada de p24 de VIH-1 y una expresión aumentada de ADN proviral mediante DC. La replicación de VIH-1 aumentada dependiente de NK en DC se inhibió mediante anticuerpos específicos para HMGB1 y mediante glicirricina, que se sabe que interacciona específicamente con

HMGB1, lo que sugiere un papel importante para esta citocina en este proceso. Como consecuencia, rh-HMGB1 tenía un efecto directo sobre DC infectadas, potenciando drásticamente la producción de p24 en sobrenadantes de cultivo. También se observó un fuerte efecto estimulante de HMGB1 sobre la replicación de VIH en DC en cultivos conjuntos de aNK:iDC. La adición de anticuerpos neutralizantes específicos para HMGB1 o glicirricina suprimió la producción de VIH-1 mediante DC infectadas cultivadas solas o en presencia de células aNK. En conjunto, estos resultados indican que HMGB1 desencadena la replicación de VIH-1 y aumenta el ADN de VIH en DC infectadas, tanto si se añade como proteína humana recombinante a DC infectadas como si se produce por células aNK durante la intercomunicación de NK:DC.

Aunque la infección directa de DC es menos eficaz que la infección de células T CD4<sup>+40,41</sup>, hay cada vez más evidencias que indican que la transmisión de VIH a largo plazo que se media mediante DC depende de la producción viral mediante las DC<sup>42,43,44</sup>, y las DC infectadas por VIH *in vivo* podrían funcionar como reservorios virales durante la migración a los tejidos linfoides, ayudando así a propagar la infección viral.

Los inventores han mostrado por primera vez que las células NK activadas contribuyen al establecimiento de reservorios virales en DC infectadas por VIH-1. Los inventores muestran en el presente documento la capacidad de activar células NK de las iDC infectadas por VIH-1 y la implicación crucial de HMGB1, producida durante la intercomunicación de aNK-iDC, en la estimulación de la replicación y expresión de ADN proviral de VIH-1 en DC. También se ha demostrado una fuerte insuficiencia de DC infectadas maduras para inducir la polarización de Th1 tras la intercomunicación con células NK. Estas observaciones condujeron a terapias novedosas para inhibir la capacidad de VIH para fomentar eficazmente su diseminación y escapar del sistema inmunitario del huésped.

La interacción de células NK con iDC autólogas da como resultado la activación recíproca, y esta interacción parece crucial en el inicio/la amplificación de las fases iniciales de una respuesta inmunitaria, antes de generarse las células T<sup>11</sup>. Las células NK desencadenan las iDC para que maduren, y esto se produce a través de un mecanismo dependiente de HMGB1<sup>20</sup>. Se ha notificado que la maduración dependiente de NK de las iDC implica una polarización funcional de DC, con aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre intracelular, reordenación del citoesqueleto, acumulación de lisosomas secretores en la sinapsis NK/DC, y expresión regulada de IL-18 hacia las células NK que interaccionan. A su vez, las células NK secretan grandes cantidades de HMGB1, lo que induce la maduración de DC<sup>20</sup>. Los inventores han corroborado la implicación de HMGB1 en la maduración de DC dependiente de NK durante el contacto NK-DC, tal como se muestra mediante el efecto inhibitorio de anticuerpos anti-HMGB1 o glicirricina, que se sabe que interacciona específicamente con HMGB1<sup>31</sup>. Análisis mediante microscopía confocal y detección de HMGB1 en sobrenadantes de cultivo libres de células demostraron que la HMGB1 no sólo se expresaba y secretaba por células NK primarias, tal como se notifica<sup>20</sup>, sino que además se producía por DC aisladas, estando relacionado el nivel de liberación de HMGB1 con su estadio de maduración. Se detectó un nivel de HMGB1 extremadamente alto cuando se pusieron iDC en contacto con células aNK, similar al liberado por DC maduras. De manera interesante, el análisis mediante microscopía confocal de conjugados de NK-DC mostró que ambas células expresaban la citocina. Se encontró que el receptor de HMGB1, RAGE, se inducía rápidamente tras la interacción de DC con células aNK, y se regulaba adicionalmente por disminución, de manera compatible con la implicación de HMGB1 en la maduración de DC dependiente de NK. Además de contribuir a la maduración de DC, se ha mostrado que HMGB1 actúa como quimioattractor sobre iDC<sup>45</sup>, y que también se requiere para la migración de DC maduras en respuesta a ligandos CCR7 y CCR4<sup>46</sup>, estando mediadas ambas actividades por RAGE<sup>45,46</sup>. Por tanto, HMGB1 actúa como alarmina, que tiene efectos activante y quimioattractor sobre DC, y que después estimula la migración de DC desde tejidos inflamados hacia los ganglios linfáticos de drenaje<sup>45</sup>. Estas propiedades de HMGB1 tienen que tenerse en cuenta en el contexto de una infección viral no controlada, tal como la inducida por VIH.

La infección productiva de iDC con VIH-1 conservó la maduración de DC fenotípica dependiente de NK, tal como se muestra mediante la frecuencia de DC CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>, mientras que el propio VIH no indujo la maduración de DC en el intervalo de concentraciones de p24 usado (de 0,001 a 10 ng/ml). Sin embargo, la consecuencia de la interacción aNK-DC fue una potenciación significativa de la infección por VIH-1 en iDC. Esto se mostró mediante varios medios, indicando una frecuencia aumentada de DC p24<sup>+</sup>, asociada con una potenciación significativa de liberación de p24 en sobrenadante de cultivo de NK-DC, y esto se confirmó mediante inmunofluorescencia a nivel de células individuales. Además, la intercomunicación de NK-DC dio como resultado un drástico aumento en la expresión de ADN de VIH-1 proviral en DC. Teniendo en cuenta el papel crucial de HMGB1 durante la activación recíproca de DC y células NK, se evaluó su contribución al desencadenamiento de la replicación de VIH-1 en iDC con anticuerpos anti-HMGB1 bloqueantes o glicirricina. El fuerte efecto bloqueante de estos inhibidores sobre la liberación de p24 indica la implicación de HMGB1 en el proceso. Merece la pena indicar que ambos inhibidores también disminuyeron significativamente la replicación de VIH-1 en cultivos de 24 h de iDC infectadas, en ausencia de células NK. Es probable que esto se deba a la liberación espontánea HMGB1 mediante iDC, mostrada aquí y anteriormente notificada<sup>46</sup>, que se conservó tras su infección con VIH-1. Estas observaciones revelan un papel fundamental para HMGB1 en el control de la replicación de VIH-1 en DC. Como consecuencia, se demostró que rh-HMGB1 aumentaba significativamente la liberación de p24 en sobrenadantes de cultivo de DC infectadas y de cultivos conjuntos de aNK-DC infectadas. Estos datos pueden tener importantes implicaciones en la comprensión de la patogénesis de VIH, ya que se encontró que los niveles de HMGB1 en plasma estaban elevados en pacientes con infección crónica por VIH-1, con las mayores concentraciones en pacientes con complicaciones clínicas<sup>47</sup>. Además,

se notificó que la HMGB1 exógena inducía *in vitro* la reactivación de VIH-1 en PBMC de pacientes con infección por VIH-1 que recibían terapia antirretroviral<sup>39</sup>.

La HMGB1 secretada es necesaria para la proliferación, supervivencia y polarización de células T CD4 no diferenciadas tras la activación mediante DC alogénicas, y estos efectos implican a RAGE expresado por DC<sup>48</sup>. En este caso, se mostró que, en condiciones singénicas, HMGB1 no podía inducir por sí misma la polarización de Th1. De hecho, no se indujo ninguna respuesta de Th1 en presencia de DC infectadas por VIH-1, aunque continuaban produciendo niveles normales de HMGB1, mientras se inhibían en cuanto a la liberación de IL-12 e IL-18. Recientes estudios destacaron el papel esencial de células NK en la modulación de la polarización de Th1, lo que sugiere que desencadenan la liberación de IL-12 e IL-18 mediante DC, fomentando la producción de IFN- $\gamma$  por células NK que a su vez desencadenan la diferenciación de células T hacia células Th1<sup>49,50</sup>. Aquí se confirma el papel esencial de IL-12 e IL-18 sobre la diferenciación Th1, ya que el defecto de DC infectadas por VIH-1 para producir una cantidad aumentada de IL-12 e IL-18 en respuesta a la activación de células NK se asoció con una polarización de Th1 defectuosa. Este defecto se relacionó directamente con la replicación de VIH-1 en DC, tal como se muestra mediante el efecto positivo del inhibidor de VIH, AZT. Estas observaciones sugieren que algunas de las alteraciones funcionales notificadas en DC de pacientes infectados por VIH<sup>51,52</sup>, tales como una secreción reducida de varias citocinas, incluyendo IL-12, y una capacidad insuficiente para sensibilizar células T CD4 autólogas, pueden estar relacionadas con una intercomunicación de NK-DC defectuosa, tal como se sugirió recientemente<sup>30</sup>.

Los inventores muestran que la activación de la replicación de VIH-1 y el establecimiento de reservorios virales en DC infectadas por VIH-1 dependen de una intercomunicación entre células aNK y DC autólogas, y han identificado el papel fundamental de HMGB1 en este proceso, producido tanto por células NK como por DC durante su intercomunicación, y han mostrado que el desencadenamiento dependiente de NK de la replicación de VIH en DC se suprime completamente mediante glicirricina, que se une específicamente a HMGB1, o mediante bloqueo con anticuerpos anti-HMGB1. Además, se ha demostrado una fuerte insuficiencia de la capacidad de DC infectadas por VIH-1 para inducir polarización de Th1 tras su intercomunicación con células NK. Se describen métodos de tratamiento y monitorización de la infección por VIH basándose en el papel de la intercomunicación de NK-DC en fomentar la diseminación viral, y en la implicación *in vivo* de HMGB1 en el desencadenamiento de la replicación viral y el reabastecimiento de reservorios virales.

Ejemplo 1: Las células NK activadas inducen la maduración de células dendríticas inmaduras, primarias, autólogas, infectadas por VIH-1.

Se investigó el papel de células NK sobre la maduración de DC generando DC derivadas de monocitos a partir de monocitos aislados y cultivándolas conjuntamente con células NK purificadas del mismo donante. Las células NK o bien estaban en reposo (rNK) o bien se activaron mediante una combinación de PHA e IL-2 (aNK). 24 h de cultivo conjunto de células aNK con DC inmaduras autólogas (iDC) indujeron o bien la supervivencia o bien la apoptosis de iDC, dependiendo de la razón de NK-DC, de manera que concordaba con informes anteriores<sup>14</sup>. De hecho, una razón de aNK-DC de 5:1 indujo apoptosis de DC, mientras que una razón de 1:5 indujo supervivencia de DC. (Figura 1a). Se asoció la supervivencia de iDC a una razón de NK-DC de 1:5 con su maduración, tal como se muestra mediante la expresión conjunta aumentada de los marcadores de maduración CD86 y HLA-DR (el 72,1% de DC CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup> se indujeron mediante células aNK en comparación con el 15,3% en el nivel inicial) (figura 1b), una característica de DC maduras. En las mismas condiciones experimentales, las células rNK tenían un efecto más débil sobre la maduración de DC, tal como se evaluó mediante la proporción de DC CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup> (figura 1b, e). Tras la infección de iDC con VIH-1, la maduración de iDC dependiente de NK no se vio alterada (figura 1b), en condiciones de infección productiva de iDC, medida en el día 3 mediante liberación de p24 en sobrenadante de cultivo y tinción intracelular de iDC para determinar p24 (figura 1c).

Se encontró el efecto directo de VIH sobre la maduración de DC a concentraciones que oscilaban entre 0,001 y 10 ng/ml, en las que VIH no pudo aumentar la expresión de los marcadores de maduración CD86 y HLA-DR, al contrario que LPS, usado como control positivo como fuerte inductor de la maduración de DC (figura 1b,d). Datos de tres donantes representativos, mostrados en la figura 1e, confirman el alto impacto de las células aNK sobre la maduración de iDC tras 24 h de cultivo conjunto, independientemente del estado infectado o no infectado de las iDC. Estos datos muestran que iDC infectadas de manera productiva por VIH-1 mantienen una propensión normal a la maduración inducida por células NK durante la intercomunicación de NK-DC.

Ejemplo 2: La intercomunicación de aNK-DC desencadena la expresión de HMGB1 tanto en células NK como en DC

Con el fin de identificar las moléculas implicadas en la maduración de iDC dependiente de aNK, se empleó una determinación de perfil de múltiples analitos (MAP) para mapear las citocinas clave producidas en cultivo de 24 h de iDC, células NK y aNK:iDC. Las iDC liberaron bajas cantidades de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12, y no produjeron IL-10 o TNF- $\alpha$ . Tras su cultivo conjunto con células aNK, se indujo un perfil de citocinas proinflamatorias, con un alto aumento en la secreción de IL-12, niveles significativos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , ambos derivados de células NK, y ausencia de producción de IL-10 (figura 2a). De manera interesante, se detectaron altos niveles de HMGB1 en aquellos sobrenadantes de cultivo que se originaron tanto de iDC como de células NK, y los cultivos conjuntos de aNK:iDC dieron como resultado una fuerte potenciación de la concentración de HMGB1 en sobrenadantes de cultivo

(figura 2a). Se confirmó que a nivel de células individuales, mediante microscopía confocal, las células NK podían producir HMGB1, detectado en el núcleo de células NK recién aisladas (figura 2b), y además se translocaron al citoplasma en células aNK (figura 2c). Tras una incubación de 3 h con VIH-1, las células aNK mostraron una fuerte disminución de la expresión de HMGB1, detectada tanto en sobrenadantes de cultivo como mediante microscopía confocal (figura 2c). Después el nivel de HMGB1 alcanzó un nivel comparable al de células rNK (figura 2a). Los inventores verificaron que las células NK no podían replicar VIH-1, tal como se muestra mediante la ausencia de detección de p24 en sobrenadante de cultivo y la ausencia de tinción de p24 intracelular (detectado mediante FACS) en células NK (datos no mostrados). También se secretó HMGB1 mediante iDC y, una vez infectadas, todavía produjeron una cantidad comparable de la citocina en sobrenadantes de cultivo (figura 2d). HMGB1 se detectó principalmente en el citoplasma de iDC, tanto infectadas por VIH-1 como no (figura 2e), y la expresión de p24 en DC infectadas no alteró la expresión de HMGB1, tal como se muestra mediante tinción intracelular doble para p24 y HMGB1 (figura 2e). Cuando se cultivaron conjuntamente iDC con células aNK, se observó una fuerte inducción de secreción de HMGB1 en sobrenadantes de cultivo (figura 2d), alcanzando niveles comparables a los producidos mediante DC maduras, es decir DC0, DC1 y DC2 (figura 2f). Sorprendentemente, la infección por VIH-1 de iDC no afectó a la cantidad de HMGB1 producida en cultivos conjuntos de NK-DC (figura 2d) y en cultivos de DC maduras (figura 2f). El análisis mediante microscopía confocal mostró la formación de conjugados entre células aNK e iDC, que también se observaron cuando se cultivaron conjuntamente células aNK con DC infectadas por VIH-1, y ambas células expresaron HMGB1, independientemente del estado infectado de DC (figura 2g). Estos resultados demuestran que HMGB1 se expresa tanto por células NK como por iDC durante la intercomunicación de NK-DC, y este proceso no se ve alterado por la infección por VIH-1 de iDC.

Ejemplo 3: La maduración dependiente de aNK de iDC infectadas por VIH-1 está mediada por HMGB1 e implica RAGE

Para determinar la posible implicación de HMGB1 en la maduración de DC dependiente de NK, se usó glicirricina, que se sabe que interacciona específicamente con la molécula de HMGB1 soluble<sup>31</sup>, así como anticuerpos anti-HMGB1 (figura 3a). Estos inhibidores, añadidos al inicio del cultivo conjunto de aNK-iDC de 24 h, redujeron las proporciones de DC maduras (identificadas como CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>) hasta el nivel inicial observado sin células aNK (figura 3a). Se obtuvo un efecto similar con DC infectadas (figura 3a). rh-HMGB1 en sí misma no indujo maduración fenotípica de iDC, cuando se trataron durante 24 h con rh-HMGB1 de 1 a 10 µg/ml, y se obtuvieron datos similares a las 48 h de cultivo (figura 3b). De hecho, aunque se observó maduración espontánea de iDC tras 48 h de cultivo en medio, tal como se muestra mediante el alto porcentaje de DC CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>, rh-HMGB1 10 µg/ml sólo aumentó levemente desde el 65% hasta el 71% el porcentaje de estas células. De manera interesante, las DC tratadas con rh-HMGB1 no eran completamente maduras, tal como se evaluó mediante la ausencia de expresión de CD80, CD83 y la débil expresión de DC-lamp, todos ellos completamente expresados en mDC (DC0) (figura 3b). Sin embargo, esas DC parcialmente maduras eran funcionalmente sensibles a rh-HMGB1 tal como se muestra mediante la liberación aumentada de las quimiocinas, MCP1, MIP-1α, MIP-1β e IL-8 por DC tratadas con hr-HMGB1 (figura 3c). Los receptores de HMGB1 incluyen RAGE<sup>32,33</sup>, TLR-2 y TLR-4<sup>34</sup>. RAGE fue el primer receptor identificado para HMGB1, se expresa por una variedad de células inmunitarias incluyendo células T, monocitos, macrófagos y DC<sup>35</sup>, y se usa por DC en maduración para dirigirse *in vivo* a ganglios linfáticos<sup>36</sup>. Mientras que TLR-2 y TLR-4 apenas se detectaron en iDC (no mostrado), RAGE se expresó completamente en DC, tal como se muestra mediante citometría de flujo, y su expresión fue incluso superior en DC0 maduras (figura 3d). Tras la incubación de iDC con 1 µg/ml de HMGB1, se observó regulación por disminución de RAGE, lo que sugiere fuertemente que estas células usaron este receptor (figura 3d). Tras la infección de DC con VIH-1, no se detectó ningún cambio en los niveles de RAGE en iDC y DC0. La incubación de DC infectadas por HMGB1 indujo una regulación por disminución similar de RAGE (figura 3d). Se evaluó la posible implicación de RAGE durante la intercomunicación de NK-DC con el mismo enfoque, comparando la expresión de RAGE en DC cultivadas conjuntamente con células aNK y DC cultivadas solas. Tras 2 h de cultivo conjunto con células aNK, las DC mostraron una regulación por incremento de la expresión de RAGE, seguido por una regulación por disminución a las 24 h (figura 3e). Se realizaron observaciones muy similares con DC infectadas por VIH-1 (figura 3e). Por tanto, HMGB1 es un factor importante para la maduración de iDC tanto sin infectar como infectadas por VIH-1 durante la intercomunicación de NK-DC, e implica a RAGE, cuya expresión en iDC no se ve alterada tras su infección productiva.

Ejemplo 4. Insuficiencia de la polarización de Th1 mediante DC infectadas por VIH-como consecuencia de una intercomunicación de NK-DC defectuosa.

La interacción de células NK con iDC da como resultado la inducción de DC polarizadas de tipo 1 que sirven como portadores de la ayuda derivada de células NK para la inducción de respuestas de Th1<sup>37</sup>. Para evaluar la capacidad de DC, tanto infectadas como no infectadas, para polarizar una respuesta de Th1 tras su intercomunicación con células aNK, se cultivaron conjuntamente células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> sin diferenciar durante 8 días en presencia de DC y células aNK, y se determinó la polarización de Th1 mediante la detección en células T de la producción intracelular de IFN-γ e IL-4, medida mediante FACS (figura 4a). El cultivo conjunto de células T sin diferenciar con iDC no aumentó la proporción de células T positivas para IFN-γ, y se obtuvieron datos similares en cultivo conjunto de células T sin diferenciar con iDC y células rNK. En cambio, cultivos conjuntos de células T sin diferenciar con iDC en presencia de células aNK indujeron un aumento significativo de la respuesta de células T con IFN-γ (figura 4b), lo

que sugiere que la intercomunicación de aNK:iDC es esencial para la polarización de Th1. Cuando se realizó el mismo experimento con DC infectadas por VIH-1, no se observó ninguna polarización de Th1 (figura 4c). La contribución de la replicación de VIH-1 a la inhibición de la polarización de Th1 se mostró mediante la adición de AZT, que restauró la respuesta de células T con IFN- $\gamma$  aumentada inducida por DC infectadas cultivadas conjuntamente con células aNK (figura 4d). Se usó AZT a una concentración que inhibía el viral de replicación en estas condiciones, tal como se evalúa mediante la dosificación de antígeno p24 en los sobrenadantes (datos no mostrados). IL-12 e IL-18 son citocinas críticas producidas mediante DC e implicadas en la polarización de Th1. Esto abordó la cuestión del impacto de la intercomunicación de aNK-DC sobre la liberación de estas citocinas mediante DC. Se encontró que la intercomunicación de aNK-DC desencadena la secreción tanto de IL-12 como de IL-18 mediante DC no infectadas. De manera importante, ya no se detectó la producción de ninguna de las citocinas en cultivos conjuntos de células aNK y DC infectadas (figura 4e, f). Además, ya no se detectó el desencadenamiento de la producción de IFN- $\gamma$  mediante células NK durante la intercomunicación de aNK-DC cuando se realizó el cultivo conjunto con DC infectadas por VIH-1 (figura 4g). Por tanto, la sensibilización de DC para la polarización de Th1 se produce durante la intercomunicación de aNK-iDC, mediante la inducción de citocinas tales como IL-12 e IL-18 liberadas por DC, e IFN- $\gamma$  liberada por células NK. Tras su infección por VIH-1, las iDC ya no pueden polarizarse mediante células aNK, debido a una intercomunicación de NK-DC defectuosa. Por consiguiente, las DC infectadas por VIH-1 presentan insuficiencia en cuanto a su capacidad para inducir polarización Th1.

Ejemplo 5: Papel fundamental de HMGB1 en el desencadenamiento dependiente de NK-DC de la replicación y persistencia de VIH-1 en iDC

Dado que se mostró que la insuficiencia de la polarización de Th1 mediante DC infectadas por VIH-1 sensibilizadas por NK dependía de la replicación de VIH-1 (figura 4d), los inventores sometieron a prueba si la interacción de aNK-iDC podía desencadenar la replicación de VIH-1 en iDC. Se infectaron iDC durante 3 h con VIH-1 (1 ng/ml de p24) y se cultivaron adicionalmente o bien solas o bien en presencia de rNK o aNK durante 18 h, y se determinó la frecuencia de DC con expresión intracelular de p24 mediante citometría de flujo. Mientras que el porcentaje de DC p24<sup>+</sup> era bastante bajo cuando se cultivaron iDC infectadas solas, aumentó significativamente tras su interacción con células aNK, representando las DC p24<sup>+</sup> casi un tercio de todas las DC en comparación con tan sólo el 4% en ausencia de células NK (figura 5a). En las mismas condiciones, las células rNK no tuvieron ningún efecto sobre la replicación de VIH en iDC (figura 5a). Se confirmó la replicación de VIH aumentada dependiente de aNK en DC infectadas mediante detección de antígeno p24 en sobrenadantes de cultivo, y se detectó un aumento estadísticamente significativo de la producción de p24 en cultivos conjuntos de aNK con VIH-1-iDC en comparación con iDC infectadas cultivadas solas o con células rNK (figura 5b). Se confirmó el efecto drástico de la interacción NK-DC sobre la frecuencia de DC que expresaban p24 mediante microscopía confocal con anticuerpos específicos para p24. Aunque muy pocas DC presentaron tinción positiva para p24 intracelular en el día tras su infección, se observó un alto número de DC p24<sup>+</sup> tras su cultivo con células aNK (figura 5c). De manera interesante, se observó de manera similar la influencia positiva de células aNK sobre la replicación de VIH en iDC con DC maduras. Se encontró una frecuencia aumentada de DC p24<sup>+</sup>, detectadas mediante FACS, en DC0 infectadas por VIH-1 cultivadas conjuntamente durante 24 h con células aNK en comparación con DC0 cultivadas solas (figura 5d), y la detección de p24 en sobrenadantes de cultivo a partir de DC0, DC1 y DC2 maduras infectadas por VIH-1, cultivadas conjuntamente con células aNK, confirmó el efecto estimulante significativo de células aNK sobre la replicación de VIH-1 en DC maduras (figura 5f y g). Debe observarse que las células rNK no tuvieron un impacto significativo sobre la replicación de VIH-1 en DC infectadas maduras (figura 5f y g). Los inventores sometieron después a prueba si las células aNK tenían una influencia sobre la expresión de ADN proviral en iDC. Los datos en la figura 5 (e) muestran que se detectó un aumento muy alto del número de copias de ADN proviral de VIH-1 en cultivos de iDC infectadas con células aNK, en comparación con el de iDC infectadas con células rNK o iDC infectadas solas.

Recientemente se notificó que HMGB1 exógena aumentaba la replicación de VIH-1 en líneas de células monocíticas infectadas<sup>38</sup>, e inducía *in vitro* la reactivación de VIH-1 en PBMC de pacientes infectados por VIH-1 que recibían terapia antirretroviral<sup>39</sup>. Por tanto, se abordó la cuestión del papel de HMGB1 en el desencadenamiento dependiente de NK de la replicación de VIH en DC. Se encontró que rh-HMGB1 exógena tenía un efecto directo sobre iDC infectadas por VIH-1, potenciando drásticamente la producción de p24 en sobrenadantes de cultivo (figura 6a). rh-HMGB1 también tuvo un efecto estimulante significativo sobre la producción de p24 por iDC infectadas por VIH-1 cultivadas conjuntamente con células aNK (figura 6a). Para investigar la influencia de HMGB1 en el desencadenamiento de la replicación de VIH-1 en cultivos conjuntos de iDC infectadas-aNK, se añadieron anticuerpos neutralizantes específicos para HMGB1 o glicirricina a estos cultivos conjuntos y se midió la producción de p24 en el sobrenadante. Ambos inhibidores de HMGB1 suprimieron la producción de VIH-1 mediante DC infectadas conjuntamente con células aNK o cultivadas solas (figura 6b). Estos resultados indican que la HMGB1 exógena puede desencadenar la replicación de VIH-1 mediante iDC infectadas. También indican que la estimulación dependiente de células aNK de la replicación de VIH-1 en iDC está mediada por HMGB1.

Ejemplo 6: Aislamiento y separación de células primarias

Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre de donantes sanos (EFS Cabanel, Paris, Francia) con un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Se aislaron monocitos CD14<sup>+</sup> de las PBMC mediante selección positiva usando perlas inmunomagnéticas específicas para CD14 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA).



Para generar iDC, se cultivaron monocitos CD14<sup>+</sup> purificados durante 6 días (1X10<sup>6</sup> células/ml) en medio RPMI 1640 complementado con glutamina 2 mM, FCS al 10%, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), en presencia de 10 ng/ml de GM-CSF humano recombinante (rhu) y rhIL-4 10 ng/ml (Peptotech INC, Rockyhill, EE.UU.) tal como se describe<sup>53</sup>. Se reemplazó el medio de cultivo cada 2 días. Se aislaron las células NK mediante selección negativa de las PBMC con reducción de monocitos usando un cóctel de reducción de anticuerpos dirigidos hacia CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD123, CD66b, glicoforina A (StemCell Technologies). El contenido en células NK de la fracción enriquecida, determinado mediante citometría de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) como células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> con anticuerpos anti-CD3 conjugados con FITC y anti-CD56 conjugados con APC, osciló entre el 85 y el 95% en los diferentes experimentos. La contaminación con células mieloides, evaluada con anticuerpos anti-CD14 conjugados con FITC, fue sistemáticamente inferior al 1%. Se aislaron células T CD4 no diferenciadas (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) de PBMC mediante selección positiva, usando perlas inmunomagnéticas específicas para CD4 y CD45RA (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). La pureza celular de células T CD4 no diferenciadas aisladas fue rutinariamente superior al 90%.

#### 15 Ejemplos 7: Activación e infección de células NK

Se cultivaron células NK purificadas a 10<sup>6</sup> células/ml o bien en presencia de una concentración inferior a la óptima de IL-2 (100 ng/ml) (Peptotech) para mantenerlas vivas (denominadas rNK) o bien activadas mediante una combinación de PHA (10 µg/ml) (Sigma) e IL-2 (10 µg/ml) (denominadas células aNK). En algunos experimentos, se incubaron células aNK (10<sup>6</sup> células/ml) durante 3 h en presencia de VIH-1 (p24 1 ng/ml) y se cultivaron adicionalmente durante 21 h. En esas condiciones, no pudo observarse una infección productiva. Después se sometieron a prueba sobrenadantes de cultivo para la detección de citocinas y quimiocinas (véase a continuación).

#### 25 Ejemplo 8: Maduración y análisis fenotípico de células dendríticas

Tras 6 días de cultivo en presencia de IL-4 y GM-CSF, o bien no se estimularon iDC (10<sup>6</sup> células/ml) o bien se estimularon durante 48 h con LPS 10 µg/ml (*E. coli* serotipo 026-B6, Sigma-Aldrich) para obtener células DC0, o 500 ng/ml de CD40L trimérico (Sigma-Aldrich) para obtener células DC1, o 10 µg/ml de LPS y PGE2 1 µg/ml (Sigma-Aldrich) para obtener células DC2. Se realizaron el análisis fenotípico de DC y la caracterización de su estadio de maduración mediante citometría de flujo. Se tiñeron DC durante 20 min a 4°C con anticuerpos específicos para CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD40, DC-LAMP o DC-SIGN (todos los anticuerpos de BD Biosciences, San Jose, CA) diluidos en 100 µl de PBS/FCS al 10%/NaN<sub>3</sub> al 0,1%. En algunos experimentos, se usó anticuerpo específico para receptor de HMGB1, RAGE (Abcam), para teñir las DC. Tras dos lavados, se fijaron las células en PFA al 1%, se adquirieron inmediatamente con un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson) y se analizaron con software Flow Jo.

#### 40 Ejemplo 9: Infección de células dendríticas con VIH-1

Se preparó una preparación de disolución madre de virus mediante amplificación de R5-HIV-1Ba-L en MDM a partir de donantes sanos. Después se aclaró la disolución madre viral mediante centrifugación antes de la determinación de la concentración de p24 de VIH-1. Se sembraron en placa las iDC en placas de cultivo de 96 pocillos a 200.000 células/pocillo y se incubaron durante 3 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con R5-HIV-1BAL a diversas concentraciones (de 0,001 a 10 ng de p24/ml). Se recogieron las células, se lavaron cuatro veces con medios que contenían FCS al 10% y, cuando se indica, se añadieron células rNK o aNK a una razón de NK:DC de 1:5, a menos que se indique lo contrario. Los cultivos conjuntos de NK-DC duraron 24 h antes del análisis del estadio de maduración de las DC y/o la cuantificación de la producción viral. En algunos experimentos (figura 6), se incubaron iDC infectadas por VIH-1 solas o con células aNK durante 3 días, en presencia de rh-HMGB1 (1 µg/ml) (R&D Systems), y en algunos cultivos en presencia de Ac de conejo anti-HMGB1 (10 µg/ml) (Abcam, Cambridge, R.U.) o glicirricina (10 µg/ml).

#### 50 Ejemplo 10: Cuantificación de la producción viral de VIH-1, la carga proviral y de la frecuencia de DC infectadas

Se determinó la concentración de VIH-1 en el sobrenadante de cultivos de célula infectadas midiendo la cantidad de proteína p24 mediante ELISA (Ingen, Bélgica). Se extrajo ADN de células usando el minikit de ADN en sangre GIAamp (Qiagen, Basilea, Suiza) y se cuantificó la carga proviral de VIH-1 mediante RT-PCR tal como se describió anteriormente<sup>54</sup>. Se determinó la frecuencia de células infectadas por VIH-1 mediante citometría de flujo para detectar la molécula intracelular p24. Se tiñeron en superficie las células con anticuerpos específicos para CD40 (BD Biosciences, San Jose, CA) para seleccionar como diana DC y se tiñeron de manera intracelular con anticuerpos específicos para p24 (Coulter). Se fijaron las células teñidas en PFA al 1%, se adquirieron inmediatamente en un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson) y se analizaron con software FlowJo. En algunos experimentos se obtuvieron imágenes de DC infectadas, tras inmunofluorescencia, mediante microscopía confocal de barrido con láser.

#### 65 Ejemplo 11: Cultivos conjuntos de iDC con células NK

Se cultivaron conjuntamente rNK o aNK durante 24 h con iDC o mDC a una razón de 1:5 ( $2 \times 10^5$  NK +  $10 \times 10^5$  DC/1 ml), a menos que se indique lo contrario. Se determinó la supervivencia de DC con el ensayo 7-AAD, tal como se describió anteriormente<sup>55</sup>. En resumen, se tiñeron células cultivadas con tinte nuclear 7-amino-actinomicina D 20  $\mu\text{g/ml}$  (7-AAD; St. Quentin-Fallavier, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 4°C, y se tiñeron conjuntamente con anticuerpo específico para CD56 (BD Biosciences, San Jose, CA). Se identificaron DC supervivientes como células CD56<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>. Cuando se realizó la caracterización fenotípica de DC en cultivos conjuntos de NK-DC, siempre se excluyeron las células NK del análisis mediante FACS mediante su tinción con anticuerpos específicos para CD56.

#### 10 Ejemplo 12: Medición de la producción de citocinas y quimiocinas

Se prepararon sobrenadantes de cultivo libres de células incubando durante 24 h iDC a  $10^6$  células /ml, células rNK o aNK a  $2,10^5$  células/ml o células aNK y iDC a la razón de 1:5. Se midieron las quimiocinas y citocinas mediante Luminex (kits de 24-plex; Biosource) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante o patrón con perlas unidas a anticuerpo durante 2 h, se lavaron dos veces con disolución de lavado, y se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios biotinilados. Una incubación final de 30 min con estreptavidina-PE precedió a la adquisición en el instrumento Luminex 100IS. Se adquirieron al menos 100 acontecimientos para cada analito. Se sustituyeron los valores por encima o por debajo de las curvas patrón por las concentraciones más baja o más alta medidas. Se realizó la cuantificación de HMGB1 en los sobrenadantes de cultivo libres de células con un kit ELISA (IBL, Hamburgo). En experimentos que sometieron a prueba la polarización de Th1 de células T CD4 no diferenciadas mediante DC desencadenadas por NK (figura 4), se realizó la cuantificación de IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-18 en sobrenadantes de cultivo con kits de ELISA (kits de IL-12 e IFN- $\gamma$  de R&D Systems, kit de IL-18 de MBL).

#### 25 Ejemplo 13: Ensayo de polarización de Th1

Se cultivaron conjuntamente células T CD4 no diferenciadas ( $10^6$ /ml) durante 8 días en presencia de iDC no infectadas o infectadas por VIH-1 ( $10^6$ /ml) y células NK en reposo o activadas ( $2 \times 10^5$ /ml) y se sometieron a prueba para determinar la polarización de Th1 mediante citometría de flujo, tal como se notificó anteriormente<sup>56</sup>. En resumen, se añadió brefeldina A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma Aldrich) durante las últimas 16 h del cultivo para inhibir la secreción de proteína. Se realizó la tinción de superficie con anticuerpos contra CD8 conjugados con PerCP y anticuerpos contra CD3 conjugados con FITC (BD Biosciences, San Jose, CA), seguido por fijación celular durante 15 minutos a 4°C con PFA al 1% y permeabilización con tampón de saponina (PBS-BSA al 0,2%-Na<sub>3</sub> al 0,01%-saponina al 0,5%), y se realizó la tinción intracelular con anticuerpos específicos para IFN $\gamma$  o IL-4 conjugados con APC (BD Biosciences, San Jose, CA). Se adquirieron inmediatamente las células teñidas en un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson) y se analizaron con software Flow Jo. Con el fin de analizar la influencia de la replicación de VIH-1 sobre la polarización de Th1, se añadió AZT 1 mM al inicio del cultivo de células T CD4 no diferenciadas incubadas solas o en presencia de iDC infectadas por VIH-1 +/- células rNK o aNK. Se dejó AZT hasta el final del cultivo conjunto. Se realizó la infección por VIH-1 de iDC tal como se describió anteriormente, en ausencia de AZT.

#### Ejemplo 14: Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos con la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. Se notifica el valor de P de diferencias significativas. Los datos representados gráficamente representan la media  $\pm$  desviación estándar (d.e.).

Ejemplo 15: Las células dendríticas infectadas por VIH-1 son resistentes a la apoptosis inducida por NK a través de un mecanismo dependiente de HMGB1

Las células dendríticas (DC) y los linfocitos citolíticos naturales (NK) son efectores innatos clave que desempeñan un papel crítico en las defensas tempranas frente a infecciones. Recientemente han surgido evidencias de una intercomunicación de NK-DC. Esta intercomunicación es bidireccional y puede conducir tanto a la activación de células NK como a la diferenciación para dar linfocitos citolíticos, maduración o apoptosis de DC, dependiendo del estado de activación de ambos tipos de célula. Se requieren DC para la sensibilización de células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> para dar efectores Th1, y la expresión crónica de virus no controlados, tales como VIH, puede inducir una maduración y destrucción alteradas de DC. En este estudio, se abordó la cuestión del impacto de la interacción NK-DC sobre la destrucción de DC, y la influencia de VIH sobre esta intercomunicación.

Se prepararon DC inmaduras (iDC) a partir de monocitos clasificados de donantes sanos, se cultivaron durante 6 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. En algunos experimentos, se infectaron iDC con R5 de VIH-1 (1 ng/ml de p24). Se realizaron experimentos de cultivos conjuntos con células aNK purificadas autólogas (activadas mediante PHA+IL-2) a diversas razones de NK:DC. Se analizó la influencia de la interacción NK-DC sobre la maduración y apoptosis de DC usando citometría de flujo multiparamétrica, combinando la tinción con 7-AAD con la tinción de membrana e intracelular con AcM específicos para HLA-DR, DC-SIGN, CD83, CD86, DR4, mTRAIL, etc.

Se encontró que las células aNK inducían rápidamente (en el plazo de 1-2 h) apoptosis de iDC no infectadas a la razón de NK:DC de 5:1. La videomicroscopía en directo de cultivos conjuntos de NK-DC confirmó que directamente tras un contacto NK-DC, las DC mostraban un fenotipo apoptótico atípico (aumento del volumen de las células y burbujeo) (figura 7). Las DC supervivientes muestran el fenotipo de células maduras (figura 8). La apoptosis de iDC implica ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) producido por células aNK, y está mediada por la interacción entre células NK CD56<sup>bright</sup> que expresan TRAIL a nivel de su membrana y DC que expresan el receptor de TRAIL, DR4. La apoptosis de iDC dependiente de NK se suprime completamente mediante anticuerpos anti-DR4 neutralizantes, destacando el importante papel de la ruta dependiente de TRAIL en este proceso (figura 9). Sin embargo, la adición de concanamina A (un inhibidor de la citotoxicidad dependiente de gránulos) a cultivos conjuntos de NK-DC no tiene ningún efecto sobre la apoptosis de DC dependiente de NK, excluyendo la implicación de la ruta de perforina en la apoptosis de DC.

Para investigar el impacto de VIH sobre la apoptosis de iDC inducida por aNK, se infectaron iDC con R5 de VIH-1 (1 ng de p24/ml). Tras la infección por VIH, las iDC se volvieron resistentes a una apoptosis dependiente de aNK. VIH-1 no indujo en sí mismo la maduración de iDC, tal como se muestra mediante la tinción conjunta con CD86/HLA-DR de iDC infectadas (figura 10). La secreción de TRAIL por células aNK no se vio afectada por la infección por VIH de iDC, y las DC infectadas por VIH-1 todavía fueron propensas a apoptosis inducida por TRAIL (figura 10). Se encontró que la resistencia de iDC infectadas por VIH-1 a la apoptosis inducida por aNK era dependiente de HMGB1, tal como se muestra mediante ensayos de inhibición en presencia de glicirricina o anticuerpos anti-HMGB1 bloqueantes (figura 11). También se encontró que la resistencia de iDC infectadas por VIH-1 a la apoptosis inducida por aNK era dependiente de la replicación de VIH-1 en DC, tal como se demuestra mediante la adición de azidotimidina (AZT) en el momento de la infección de iDC (figura 11). En conjunto, estos resultados muestran que la infección por VIH-1 de iDC induce resistencia de iDC infectadas a la apoptosis inducida por aNK, que implica a la citocina proinflamatoria HMGB1.

Los inventores reconocieron anteriormente que la intercomunicación entre células aNK y iDC infectadas por VIH-1 daba como resultado un drástico aumento en la replicación viral y la expresión de ADN proviral en DC, y este proceso se desencadenaba principalmente por HMGB1. Los resultados en este ejemplo muestran la implicación crítica de HMGB1 como mediador clave en la supervivencia de DC infectadas por VIH-1, destacando entonces el papel de HMGB1 en la persistencia viral y el establecimiento de reservorios de VIH. Estos resultados muestran cómo el VIH "secuestra" las DC para fomentar eficazmente la diseminación viral y cómo puede usarse esta propiedad para tratar la infección por VIH.

Ejemplo 16: Experimentos de cultivos conjuntos de aNK-DC en presencia de VIH-2

Se abordó la cuestión de la propensión de DC infectadas por VIH-2 al desencadenamiento dependiente de NK de la replicación viral, de manera similar a VIH-1. Se evaluó la influencia de HMGB1 en ese proceso.

1- Infección de DC con VIH-2: se sembraron en placa iDC en placas de cultivo de 96 pocillos a 500.000 células/pocillo y se incubaron durante 3 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con VIH-2 (20 ng de p24/ml).

2- Cultivos conjuntos de NK-DC: se recogieron las células, se lavaron tres veces con RPMI que contenía FCS al 10% y, cuando se indica, se añadieron células aNK a una razón de NK:DC de 1:5. Cuando se indica, se añadió HMGB1 recombinante a 10 µg/ml (R&D Systems), o Ac de conejo anti-HMGB1 (1 µg/ml) (Abcam, Cambridge, R.U.). Los cultivos conjuntos de NK-DC duraron de 3 a 7 días antes de la cuantificación de la producción viral en sobrenadantes de cultivo.

3- Cuantificación de la producción viral de VIH-2: se determinó la concentración de partículas de VIH-2 en los sobrenadantes con el kit de ELISA para p24 (Ingen, Bélgica).

Tal como se muestra en la figura 6C, se detectó un nivel muy bajo de producción de VIH-2 tras tres días de infección, tanto si las DC infectadas se cultivaron solas como en presencia de células aNK. rh-HMGB1 indujo un ligero aumento en la replicación viral. Tal como se observó en los estudios anteriores con VIH-1, el día 3 de infección de DC es demasiado pronto como para detectar una replicación viral significativa. Estos sobrenadantes de cultivos conjuntos se someterán de nuevo a prueba en el día 7.

Ejemplo 17: Detección de proteína HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 en sueros humanos / Asociación con actividad de la enfermedad en pacientes infectados por VIH

Se cuantificó la concentración de proteína HMGB1 en sueros de pacientes infectados por VIH, según el kit de ELISA de Shino Test (IBL).

Además, se desarrolló un ensayo ELISA específico para la detección de anticuerpos específicos totales anti-HMGB1. Teniendo en cuenta que pueden encontrarse autoanticuerpos específicos para HMGB1 en SLE (lupus

eritematoso sistémico) (Hayashi *et al.*, 2009), se planteó la cuestión de si se detectaban anticuerpos anti-HMGB1 en pacientes infectados por VIH y si sus niveles se correlacionaban con la infección por VIH.

Ensayo ELISA para la detección de anticuerpos anti-HMGB1

5

Se desarrolló el ensayo en dos etapas:

10 (1) En una primera etapa, se usaron anticuerpos policlonales de conejo específicos para HMGB1 humana, para definir las condiciones para la titulación de anticuerpos sobre HMGB1 o BOX B recubiertas. Dado que se sospechaba que los anticuerpos anti-HMGB1 se encontraban como complejos inmunitarios en sueros (Urbanaviciute *et al.* Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. J Leukoc Biol. 2007 81:67-74), se desarrolló un método para disociar estos complejos antes de la titulación de anticuerpos.

15 (2) En una segunda etapa, se usaron muestras humanas de varios grupos de donantes (sueros de donantes sanos, pacientes con choque séptico o pacientes VIH<sup>+</sup> antes y después de tratamiento antirretroviral).

Se usaron los siguientes reactivos:

20 - Los anticuerpos policlonales primarios de conejo frente a HMGB1 humana (Adcam ab18256) se dirigieron frente a un péptido sintético conjugado con KLH derivado de los residuos 150 al extremo C-terminal de HMGB1 humana.

- HMGB1 recombinante (HMGBiotech, HM-115) producida en *E. Coli* a partir de un plásmido de expresión que codifica para HMGB1 de rata, idéntica en el 99% a la HMGB1 humana.

25 - BOXB recombinante de HMGB1 (HMGBiotech HM-051) producida en *E. Coli* a partir de un plásmido de expresión que codifica para la secuencia de mamífero, que es totalmente idéntica en el ser humano y el ratón.

- Suero de conejo de control (Sigma; ref.: R9133)

30 - Anticuerpo anti-IgG o IgM de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (PAL), sustrato comprimidos de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP),

- calibradores: IgG humana de suero (Sigma; ref. I2511) e IgM humana de suero (Sigma; ref. I8260)

35 - Anticuerpo anti-IgG humana (específico para Fc)-fosfatasa alcalina producido en cabra (Sigma; ref. A9544), anticuerpo anti-IgM humana (específico para cadena  $\mu$ )-fosfatasa alcalina producido en cabra (Sigma; ref. A3437).

Se llevó a cabo el siguiente ensayo:

40 Se realizó el recubrimiento de placas de 96 pocillos durante la noche a 4°C o bien con 3  $\mu$ g/ml de HMGB1 o bien con 0,5  $\mu$ g/ml de BOXB en DPBS. Simultáneamente, se realizó el recubrimiento del calibrador con diluciones en serie en DPBS de isotipos correspondientes (sólo para el ensayo ELISA llevado a cabo con muestras humanas). Se lavaron las placas cuatro veces con DPBS/Tween® 20 al 0,05% (v/v), usando un dispositivo de lavado de microplacas (Atlantis; Oasys). Se realizaron lavados similares tras cada etapa del ensayo ELISA. Se bloquearon los sitios no unidos a 4°C durante 2 horas con PBS/BSA al 2% (p/v). Se añadieron alícuotas de 100  $\mu$ l de muestras de suero diluidas en DPBS/Tween® al 0,05% (v/v)/BSA al 1% (p/v) a pocillos recubiertos y sin recubrir y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se sometieron a prueba todas las muestras de suero o bien sin tratar o bien tratadas con glicina 1,5 M (v/v, pH 1,85) durante 30 min a 25°C en un baño de agua, y se mantuvieron adicionalmente en hielo y se diluyeron con Tris 1,5 M, v/v, pH 9,0. Después se diluyeron inmediatamente las muestras (desde 1/10 hasta 1/1000) y se distribuyeron sobre placas recubiertas. Se añadieron anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (razón de 1/10000), o anticuerpos de cabra anti-IgG (razón de 1/2000) o IgM (razón de 1/2000) humanas conjugados con fosfatasa alcalina diluidos en DPBS/Tween® al 0,05% (v/v)/BSA al 1% (p/v) durante 1 hora a 37°C. Se realizó la detección de anticuerpos específicos para antígeno tras 30 min de incubación a 37°C con 100 $\mu$ l de sustrato pNPP y se detuvo la reacción mediante adición de 100 $\mu$ l de NaOH 3 M. Se calculó la concentración de anticuerpos específicos para HMGB1 o BOXB según la curva patrón obtenida a partir de la absorbancia de disolución de inmunoglobulina de patrón mediante el software Ascent, ThermoElectrocorp, tal como se notificó anteriormente en un ELISA específico para LPS de *Shigella* (Launay *et al.* Vaccine 2009, 27:1184-1191). Los datos se expresan en  $\mu$ g/ml de anticuerpos detectados.

60 Para desarrollar este ensayo, se sometieron a prueba varios parámetros, usando placas recubiertas o bien con HMGB1 o bien con BOXB para titular anticuerpos de conejo anti-ser humano. Los resultados obtenidos son los siguientes:

65 - una concentración de BSA del 2% al 5% es igual de eficaz (figura 13A);

- se eligió una dilución de 1/10.000 del anticuerpo anti-IgG-PAL por estar en la parte lineal de la curva de titulación para anticuerpos anti-HMGB1 purificados, mostrado por las flechas (figura 13B);

5 - las concentraciones de desde 2,5 hasta 5 µg/ml de HMGB1 para el recubrimiento de los pocillos fueron las más apropiadas tal como se muestra mediante la linealidad de las curvas de titulación para anticuerpos anti-HMGB1 purificados (figura 13C);

- se eligió una concentración de anticuerpo anti-HMGB1 purificado de 0,5 µg/ml (figura 13D);

10 - la prueba fue específica ya que no hay reactividad de anticuerpos de conejo no inmunitarios en comparación con anticuerpos de conejo anti-HMGB1 (figura 13E); y

15 - se obtuvieron datos comparables cuando se sometieron a prueba anticuerpos de conejo anti-ser humano purificados con placas recubiertas o bien con HMGB1 o bien con Box B. Se eligió adicionalmente Box B (la parte inmunógena principal de HMGB1) (figura 14).

#### Tratamiento ácido para la detección de anticuerpos anti-HMGB1 complejados en muestras humanas

20 Para determinar las condiciones de ensayo requeridas para someter a prueba muestras biológicas humanas, se tituló una serie de sueros humanos para determinar la presencia de anticuerpos específicos para HMGB1, y suponiendo que estaban presentes complejos de [HMGB1/Ac anti-HMGB1] en muestras biológicas, se analizó la influencia del tratamiento previo con glicina 1,5 M, pH 1,85, para disociar estos complejos inmunitarios. Se sometieron a prueba todas las muestras de suero o bien sin tratar o bien tratadas con glicina 1,5 M (v/v, pH 1,85) durante 30 min a 25°C en un baño de agua, y mantenidas adicionalmente en hielo y diluidas con Tris 1,5 M, v/v, pH 25 9,0. Después se diluyeron inmediatamente las muestras y se distribuyeron sobre placas recubiertas y se sometieron a prueba tal como se determinó anteriormente.

30 Los datos presentados en la figura 15 muestran que apenas se detectaban anticuerpos anti-HMGB1 en sueros humanos, a menos que se trataran con glicina 1,5 M para disociar los complejos inmunitarios. Por tanto, la mayor parte de los anticuerpos específicos para HMGB1 formaban complejos con HMGB1, representando un mecanismo de neutralización para moléculas proinflamatorias.

#### Cuantificación de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 en sueros de pacientes VIH<sup>+</sup>

35 Se sometieron a prueba HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 circulantes en pacientes infectados por VIH (VIH<sup>+</sup>) sin tratar a diferentes estadios de la enfermedad.

##### 1. Titulación de HMGB1 en sueros de pacientes infectados por VIH

40 La figura 16 muestra que se detectan niveles circulantes aumentados de HMGB1 en pacientes VIH<sup>+</sup> en comparación con donantes sanos (línea discontinua).

##### 2. Impacto de una terapia antirretroviral potente sobre células CD4, células CD8, ADN proviral y VL de ARN de VIH

45 En el transcurso de un seguimiento clínico de un año de siete pacientes VIH<sup>+</sup> (con carga viral detectable; VL), se midieron el efecto inmunológico de una terapia antirretroviral altamente activa (HAART) compuesta por una combinación de fármacos anti-VIH (que bloqueaban la entrada y replicación de VIH en la célula huésped), células CD4, células CD8, ADN proviral y VL de ARN de VIH al inicio de HAART (M0), y tras 1 (M1), 3 (M3), 6 (M6) y 12 (M12) meses de HAART. Los resultados se representan en la siguiente tabla y en la figura 17.

50

	PACIENTES						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
M0							
ARN de VIH (log <sub>10</sub> de cp/ml)	6,72	4,15	3,54	5,65	4,90	6,15	3,85
M1							
Δ de ARN de VIH (log <sub>10</sub> de cp/ml)	3,72	2,37	1,50	3,51	2,09	2,35	1,46
M3							
Δ de ARN de VIH (log <sub>10</sub> de cp/ml)	3,25	2,85	1,94	3,40	2,32	2,10	2,24
M6							
Δ de ARN de VIH (log <sub>10</sub> de cp/ml)	4,82	2,85	1,40	3,96	2,30	0,81	2,24
M12							
Δ de ARN de VIH (log <sub>10</sub> de cp/ml)	4,84	2,85	2,24	2,88	3,30	2,21	2,55

Esta tabla de características de pacientes muestra que HAART induce una supresión rápida y significativa de la VL de ARN de VIH en todos los pacientes (Δ de carga viral significa la diferencia entre la VL en un punto de tiempo

dado y la VL en el nivel inicial, M0), alcanzando niveles no detectables (50 copias/ml de sangre). Además, HAART induce un aumento significativo en el número de células T CD4 en la sangre, mientras que no se detectó ningún cambio en el nivel de células T CD8 (figura 17A). HAART también induce una disminución significativa en la carga viral de ARN de VIH plasmático ( $p < 0,001$  en el M1, M3 y  $p < 0,05$  en el M6 y M12 frente al M0). No se observó ningún efecto significativo sobre el ADN de VIH asociado a células (figura 17B).

3. Impacto de una terapia antirretroviral potente sobre HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 en estas muestras de suero.

Se titularon los niveles en plasma de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 al inicio de HAART (M0), y tras 1 (M1), 3 (M3), 6 (M6) y 12 (M12) meses de HAART. Se determinaron los títulos de anticuerpos mediante el ensayo descrito anteriormente, es decir que se trataron los sueros de pacientes con glicina antes de la titulación y se cuantificaron para determinar anticuerpos anti-HMGB1. Los resultados se presentan en las figuras 18 y 19.

La titulación de HMGB1 en muestras de suero de estos pacientes mostró que la supresión de la VL de ARN de VIH con HAART estaba asociada con niveles reducidos de HMGB1 (figura 18). En el M6, los niveles de HMGB1 alcanzaron los de individuos sanos (línea discontinua). Por tanto, el impacto de HAART defiende un papel impulsor de VIH sobre la producción de HMGB1.

Los datos en la figura 19 muestran que se encontraron concentraciones detectables de anticuerpos anti-HMGB1 en sueros de pacientes en el M0, y la terapia antirretroviral indujo una disminución en la concentración de anticuerpos anti-HMGB1 en el M6, alcanzando valores no detectables en el M12. Se detectó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 en comparación con el nivel inicial en el M6 ( $p = 0,05$ ) y también en puntos de tiempo posteriores (M12).

Por tanto, las mediciones combinadas de los niveles de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 indican que la infección crónica por VIH desencadena la producción de HMGB1, lo cual desencadena a su vez la producción de anticuerpos neutralizantes. Esto es un proceso dinámico que implica un retardo entre una disminución en los niveles de HMGB1 (M3) y una disminución en los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 (M6), normalizándose los niveles de ambas moléculas tras una terapia antirretroviral potente.

Correlaciones entre los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 y la carga viral de VIH

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente, se abordó una cuestión importante referente a si los niveles circulantes de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 se correlacionaban con la carga viral de ARN de VIH.

Por tanto, se sometieron a prueba muestras de suero de pacientes VIH<sup>+</sup>, en diferentes estadios de la enfermedad, con carga viral variable. Los resultados se resumen en la siguiente tabla (prueba de correlación de Spearman) y en la figura 20.

	HMGB1	VL de ARN de VIH
Ac anti-HMGB1	$r = -0,5$ $P = 0,018$ $n = 22$	$r = -0,49$ $P < 0,0001$ $n = 61$

$r$  = coeficiente de correlación;  $p < 0,05$ : >95% de probabilidad de que las dos variables estén correlacionadas;  $n$  = número de pacientes en el estudio

Tal como se muestra en la figura 20A, existe una correlación inversa entre los niveles de HMGB1 y de anticuerpos anti-HMGB1, indicando que la producción de HMGB1 induce la síntesis de anticuerpos anti-HMGB1 que neutralizan HMGB1, ya que niveles bajos de HMGB1 están asociados con niveles altos de anticuerpos.

La figura 20B demuestra que hay una correlación inversa entre los anticuerpos anti-HMGB1 y a VL, lo que sugiere que, debido a la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-HMGB1, la actividad estimulante de HMGB1 sobre la replicación viral se suprime mediante los anticuerpos.

Estos datos defienden un efecto beneficioso de la terapia basada en anticuerpos anti-HMGB1 en pacientes VIH<sup>+</sup>, que conducirá a la neutralización de HMGB1 y por tanto a una disminución en la carga viral.

Modificaciones y otras realizaciones

Aunque se ha descrito la invención en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que no se pretende que la invención tal como se reivindica se limite a tales realizaciones específicas. Se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que resultan obvias para los expertos en las técnicas médica, inmunológica, biológica, química o farmacológica o campos relacionados, queden dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**Bibliografía**

- 5 1. Meng, G. *et al.* Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat Med* 8, 150-6 (2002).
2. Pope, M. y Haase, A.T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* 9, 847-52 (2003).
- 10 3. Geijtenbeek, T.B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-97 (2000).
4. Lee, B. *et al.* cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol* 75, 12028-38 (2001).
- 15 5. Gurney, K.B. *et al.* Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DCSIGN+ cells in human rectal mucosa. *J Virol* 79, 5762-73 (2005).
6. Turville, S.G. *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3, 975-83 (2002).
- 20 7. McDonald, D. *et al.* Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300, 1295-7 (2003).
8. Arrighi, J.F. *et al.* DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 200, 1279-88 (2004).
- 25 9. Piguet, V. y Sattentau, Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* 114, 605-10 (2004).
10. Wu, L. y KewalRamani, V.N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6, 859-68 (2006).
- 30 11. Pulendran, B., Palucka, K. y Banchereau, J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293, 253-6 (2001).
- 35 12. Carbone, E. *et al.* Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29, 4022-9 (1999).
13. Fernandez, N.C. *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5, 405-11 (1999).
- 40 14. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. y Valiante, N.M. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195, 335-41 (2002).
15. Degli-Esposti, M.A. y Smyth, M.J. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5, 112-24 (2005).
- 45 16. Ferlazzo, G. *et al.* Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16606-11 (2004).
17. Ferlazzo, G. *et al.* Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343-51 (2002).
- 50 18. Borg, C. *et al.* NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104, 3267-75 (2004).
- 55 19. Marcenaro, E. *et al.* IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 174, 3992-8 (2005).
20. Semino, C., Angelini, G., Poggi, A. y Rubartelli, A. NK/iDC interaction results in IL18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106, 609-16 (2005).
- 60 21. Vitale, M. *et al.* NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566-71 (2005).
- 65 22. Della Chiesa, M. *et al.* The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33, 1657-66 (2003).

23. Park, J.S. *et al.* Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C870-9 (2003).
- 5 24. Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H. y Nakagawara, A. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically downregulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J Biol Chem* 277, 715764 (2002).
- 10 25. Gardella, S. *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3, 995-1001 (2002).
26. Zeh, H.J., 3rd y Lotze, M.T. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* 28, 1-9 (2005).
- 15 27. Lotze, M.T. y Tracey, K.J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5, 331-42 (2005).
28. Bianchi, M.E. y Manfredi, A.A. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220, 35-46 (2007).
- 20 29. Andoniou, C.E. *et al.* Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol* 6, 1011-9 (2005).
- 25 30. Mavilio, D. *et al.* Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med* 203, 2339-50 (2006).
31. Mollica, L. *et al.* Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* 14, 431-41 (2007).
- 30 32. Moser, B., Herold, K.C. y Schmidt, A.M. Receptor for advanced glycation end products and its ligands: initiators or amplifiers of joint inflammation--a bit of both? *Arthritis Rheum* 54, 14-8 (2006).
33. Bierhaus, A. *et al.* Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83, 876-86 (2005).
- 35 34. Yu, M. *et al.* HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 26,174-9 (2006).
35. Clynes, R. *et al.* Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Curr Mol Med* 7, 743-51 (2007).
- 40 36. Manfredi, A.A. *et al.* Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol* 180, 2270-5 (2008).
37. Mailliard, R.B. *et al.* Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171, 2366-73 (2003).
- 45 38. Nowak, P. *et al.* HMGB1 activates replication of latent HIV-1 in a monocytic cell-line, but inhibits HIV-1 replication in primary macrophages. *Cytokine* 34, 17-23 (2006).
- 50 39. Thierry, S. *et al.* High-mobility group box 1 protein induces HIV-1 expression from persistently infected cells. *Aids* 21, 283-92 (2007).
40. Granelli-Pipemo, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W. y Steinman, R.M. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72, 2733-7 (1998).
- 55 41. Canque, B. *et al.* The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* 93, 3866-75 (1999).
- 60 42. Turville, S.G. *et al.* Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170-9 (2004).
- 65 43. Nobile, C. *et al.* Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol* 79, 5386-99 (2005).



44. Burieigh, L. *et al.* Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* 80, 2949-57 (2006).
- 5 45. Yang, D. *et al.* High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 81, 59-66 (2007).
46. Dumitriu, I.E., Bianchi, M.E., Bacci, M., Manfredi, A.A. y Rovere-Querini, P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J Leukoc Biol* 81, 84-91 (2007).
- 10 47. Nowak, P., Barqasho, B. y Sonnerborg, A. Elevated plasma levels of high mobility group box protein 1 in patients with HIV-1 infection. *Aids* 21, 869-71 (2007).
48. Dumitriu, I.E. *et al.* Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 174, 7506-15 (2005).
- 15 49. Fehniger, T.A. *et al.* Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 162, 4511-20 (1999).
- 20 50. Agaogue, S., Marcenaro, E., Ferranti, B., Moretta, L. y Moretta, A. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18 or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* (2008).
51. Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. y Patterson, S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 101, 4505-11 (2003).
- 25 52. Smed-Sorensen, A., Lore, K., Walther-Jallow, L., Andersson, J. y Spetz, A.L. HIV-1 infected dendritic cells upregulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood* 104, 2810-7 (2004).
- 30 53. Kiertcher, S.M. y Roth, M.D. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 59, 208-18 (1996).
54. Saidi, H. *et al.* Pre-clinical development as microbicide of zinc tetra-ascorbo-camphorate, a novel terpenoid derivative: Potent in vitro inhibitory activity against both R5- and X4-tropic HIV-1 strains without significant in vivo mucosal toxicity. *AIDS Res Ther* 5, 10 (2008).
- 35 55. Lecoeur, H., Melki, M.T., Saidi, H. y Gougeon, M.L. Analysis of Apoptotic Pathways by Multiparametric Flow Cytometry: Application to HIV Infection. *Methods Enzymol* 442, 51-82 (2008).
- 40 56. Ledru, E. *et al.* A nonsecreted variant of interleukin-4 is associated with apoptosis: implication for the T helper-2 polarization in HIV infection. *Blood* 101, 3102-5 (2003).

**REIVINDICACIONES**

1. Método *in vitro* para cuantificar los anticuerpos totales específicos para la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) contenidos en una muestra biológica obtenida de un sujeto, que comprende:
  - a) tratar la muestra mediante un tratamiento ácido para disociar los complejos inmunitarios encontrados en la muestra, preferiblemente con glicina 1,5 M a un pH bajo;
  - b) poner en contacto dicha muestra biológica tratada con la proteína HMGB1 de longitud completa o un derivado de HMGB1 seleccionado del grupo que consiste en un péptido que tiene desde 10 hasta 30 residuos de aminoácidos derivado de HMGB1 y un polipéptido que tiene desde 30 hasta 215 residuos de aminoácidos derivado de HMGB1, siempre que dicho derivado de HMGB1 se una a anticuerpos específicos para HMGB1; y
  - c) cuantificar los anticuerpos totales específicos para la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1).
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha HMGB1 de longitud completa tiene un origen de mamífero, preferiblemente un origen humano.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho derivado de la proteína HMGB1 se selecciona del grupo que consiste en una HMGB1 recombinante, una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1 cuya secuencia es común para proteínas HMGB1 de diversos orígenes y la BOXB recombinante de HMGB1 correspondiente a la secuencia común para HMGB1 humana y de ratón.
4. Método *in vitro* para monitorizar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en una muestra biológica obtenida de un sujeto que se sabe que está infectado por VIH, que comprende cuantificar anticuerpos específicos para la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), en el que dichos anticuerpos seleccionados como diana para la cuantificación son o bien anticuerpos totales específicos para HMGB1 obtenidos tras realizarse una etapa de tratamiento de la muestra mediante un tratamiento ácido adecuado para la disociación de complejos inmunológicos formados con anticuerpos anti-HMGB1 específicos, o bien su fracción inmunológicamente complejada.
5. Método *in vitro* para monitorizar la eficacia de un tratamiento dirigido frente a infección por VIH en un sujeto infectado por VIH que comprende:
  - (a) llevar a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con muestras obtenidas de dicho sujeto en diferentes momentos durante el tratamiento,
  - (b) determinar la eficacia del tratamiento administrado al sujeto;
  - (c) opcionalmente, comparar los resultados obtenidos para muestras obtenidas del sujeto en diferentes momentos durante el tratamiento con un resultado obtenido con una muestra del mismo sujeto antes del inicio del tratamiento.
6. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra biológica obtenida de un sujeto infectado por VIH es sangre, plasma, suero, saliva, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) u otros tejidos o líquidos corporales.
7. Método de pronóstico *in vitro* de o bien el estado de progresión del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o bien el estado de progresión hacia SIDA, en un paciente infectado por VIH, que comprende llevar a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una muestra obtenida de dicho paciente tras la infección, y preferiblemente durante la infección primaria o aguda o durante la infección crónica, y en el que cuanto mayor es el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1, mayor es el riesgo de desarrollar SIDA o un estado avanzado de SIDA.
8. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cantidad de anticuerpos específicos para HMGB1 se determina mediante ELISA usando la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) o derivados de la misma recubiertos sobre un soporte sólido.
9. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que dichos anticuerpos cuantificados específicos para HMGB1 son anticuerpos totales específicos para HMGB1, obtenidos tras realizarse una etapa de tratamiento de la muestra mediante un tratamiento ácido adecuado para la disociación de complejos inmunológicos formados con anticuerpos anti-HMGB1 específicos.
10. Método *in vitro* para monitorizar la infección por VIH en un sujeto infectado por VIH que comprende (a) cuantificar la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) contenida en una muestra biológica,

- preferiblemente sangre, plasma, suero, saliva, PBMC u otros líquidos corporales, obtenida de dicho sujeto, preferiblemente tras poner en contacto dicha muestra biológica con anticuerpos que se unen inmunológicamente a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), en el que dicha proteína HMGB1 seleccionada como diana para la cuantificación es HMGB1 total obtenida tras el tratamiento de la muestra mediante un tratamiento ácido en condiciones que permiten que complejos inmunológicos formados con la proteína HMGB1 se disocien, o su fracción inmunológicamente complejada; y (b) opcionalmente comparar estos resultados obtenidos con una muestra del mismo sujeto antes del inicio del tratamiento.
- 5
- 10 11. Método *in vitro* para monitorizar la carga viral de VIH, en una muestra biológica obtenida de un sujeto que se sabe que está infectado por VIH, que comprende:
- 15 (a) cuantificar la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) contenida en una muestra biológica, preferiblemente sangre, plasma, suero, saliva, PBMC u otros líquidos corporales, obtenida de dicho sujeto, preferiblemente tras poner en contacto dicha muestra biológica con anticuerpos que se unen inmunológicamente a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), en el que dicha proteína HMGB1 seleccionada como diana para la cuantificación es o bien HMGB1 total obtenida tras el tratamiento de la muestra mediante un tratamiento ácido en condiciones que permiten que complejos inmunológicos formados con la proteína HMGB1 se disocien, o bien su fracción inmunológicamente complejada, en el que cuanto más proteína HMGB1 hay, mayor es la carga viral y
- 20 (b) opcionalmente, comparar la HMGB1 cuantificada en la etapa (a) con la cantidad de HMGB1 de una muestra biológica obtenida de un sujeto no infectado por VIH, o con la cantidad de HMGB1 de una muestra biológica obtenida del mismo sujeto en un momento diferente.
- 25 12. Método *in vitro* según la reivindicación 10 u 11, que comprende además al menos una prueba de diagnóstico para excluir o controlar la inflamación aguda y/o crónica en dicho sujeto.
- 30 13. Método *in vitro* para monitorizar la eficacia de un tratamiento dirigido frente a infección por VIH en un sujeto infectado por VIH, que comprende:
- 35 (a) cuantificar la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) contenida en muestras, preferiblemente sangre, plasma, suero, saliva, PBMC u otros líquidos corporales, obtenidas de dicho sujeto en diferentes momentos durante el tratamiento, preferiblemente tras poner en contacto dicha muestra biológica con anticuerpos que se unen inmunológicamente a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), en el que dicha proteína HMGB1 seleccionada como diana para la cuantificación es o bien HMGB1 total obtenida tras el tratamiento de la muestra mediante un tratamiento ácido en condiciones que permiten que complejos inmunológicos formados con la proteína HMGB1 se disocien, o bien su fracción inmunológicamente complejada, y
- 40 (b) determinar la eficacia del tratamiento administrado al sujeto, y opcionalmente comparar estos resultados obtenidos con una muestra del mismo sujeto antes del inicio del tratamiento.
- 45 14. Método de pronóstico *in vitro* o bien del estado de progresión de SIDA o bien del estado de progresión hacia SIDA, en un paciente infectado por VIH, que comprende cuantificar la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), contenida en una muestra obtenida de dicho paciente tras la infección, y preferiblemente durante la infección primaria o aguda o infección crónica, preferiblemente sangre, plasma, suero, saliva, PBMC u otros líquidos corporales, obtenida de dicho sujeto, preferiblemente tras poner en contacto dicha muestra biológica con anticuerpos que se unen inmunológicamente a la proteína de la caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1), en el que dicha proteína HMGB1 seleccionada como diana para la cuantificación es o bien HMGB1 total obtenida tras el tratamiento de la muestra mediante un tratamiento ácido en condiciones que permiten que complejos inmunológicos formados con la proteína HMGB1 se disocien, o bien su fracción inmunológicamente complejada, y en el que cuanto mayor es el nivel de proteína HMGB1, mayor es el riesgo de desarrollar SIDA o un estado avanzado de SIDA.
- 50 55 15. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho VIH es VIH-1 o VIH-2.
- 60 16. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho sujeto es un ser humano.
- 65 17. Agente seleccionado del grupo que consiste en a) glicirricina, b) un anticuerpo que bloquea específicamente HMGB1 o un fragmento de tal anticuerpo que conserva dicha capacidad de bloquear específicamente HMGB1, en particular un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena sencilla, o un fragmento Fab, Fv, Fab<sub>2</sub>, en el que tal anticuerpo o fragmento es preferiblemente humano o humanizado y c) el RAGE aislado o fragmento del mismo que puede unirse a HMGB1, para su uso como fármaco para tratar infección por VIH en seres humanos, opcionalmente en combinación con un compuesto activo

adicional frente a infección por VIH.

- 5 18. Agente seleccionado del grupo que consiste en a) glicirricina, b) un anticuerpo que bloquea específicamente HMGB1 o un fragmento de tal anticuerpo que conserva dicha capacidad de bloquear específicamente HMGB1, en particular un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena sencilla, o un fragmento Fab, Fv, Fab<sub>2</sub>, en el que tal anticuerpo o fragmento es preferiblemente humano o humanizado y c) el RAGE aislado o fragmento del mismo que puede unirse a HMGB1, para su uso como fármaco para disminuir las células de reservorio de VIH, en un sujeto infectado por VIH, opcionalmente en combinación con un compuesto activo adicional frente a infección por VIH.
- 10 19. Agente para su uso según la reivindicación 18, en el que dichas células de reservorio de VIH seleccionadas como diana son células que se originan de tejidos biológicos, tales como sangre, tejidos sólidos o mucosa, que son sensibles a y pueden infectarse por VIH, y preferiblemente células de cerebro, hígado, bazo, amígdalas, ganglios, tejido linfoide asociado al intestino (GALT), células de sangre periférica, células de linaje linfoide tales como células T especialmente células T CD4, o células derivadas de monocitos tales como macrófagos o células dendríticas.
- 15 20. Kit para cuantificar los anticuerpos totales específicos para la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) en una muestra, que comprende:
- 20 a) la proteína HMGB1 de longitud completa, en particular de origen de mamífero, preferiblemente de origen humano, o un derivado de HMGB1 seleccionado del grupo que consiste en un péptido de desde 10 hasta 30 residuos derivado de HMGB1 y un polipéptido de desde 30 hasta 215 residuos derivado de HMGB1, siempre que dicho derivado de HMGB1 se una a anticuerpos específicos para HMGB1;
- 25 b) una disolución de disociación ácida que tiene un pH de entre 1 y 3, para disociar complejos inmunológicos de HMGB1/anticuerpo anti-HMGB1 encontrados en la muestra cuando se toma del paciente, sin alterar la capacidad de unión del anticuerpo anti-HMGB1;
- 30 c) opcionalmente, un tampón de neutralización; y
- d) opcionalmente, anticuerpos secundarios que se unen al complejo de HMGB1/anticuerpos específicos.
- 35 21. Kit según la reivindicación 20, en el que dicho derivado de la proteína HMGB1 se selecciona del grupo que consiste en una HMGB1 recombinante, una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1 cuya secuencia es común para proteínas HMGB1 de diversos orígenes y la BOXB recombinante de HMGB1 correspondiente a la secuencia común para HMGB1 humana y de ratón.
- 40 22. Kit para cuantificar la proteína de la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) total en una muestra, que comprende:
- 45 a) un anticuerpo específico para la proteína HMGB1, o un fragmento del mismo que puede unirse a la proteína HMGB1;
- b) una disolución de disociación ácida que tiene un pH de entre 1 y 3, para disociar complejos inmunológicos de HMGB1/anticuerpo anti-HMGB1 encontrados en la muestra cuando se toma del paciente, sin alterar la capacidad de unión del anticuerpo anti-HMGB1;
- 50 c) opcionalmente, un tampón de neutralización; y
- d) opcionalmente, anticuerpos secundarios que se unen al complejo de HMGB1/anticuerpos específicos.

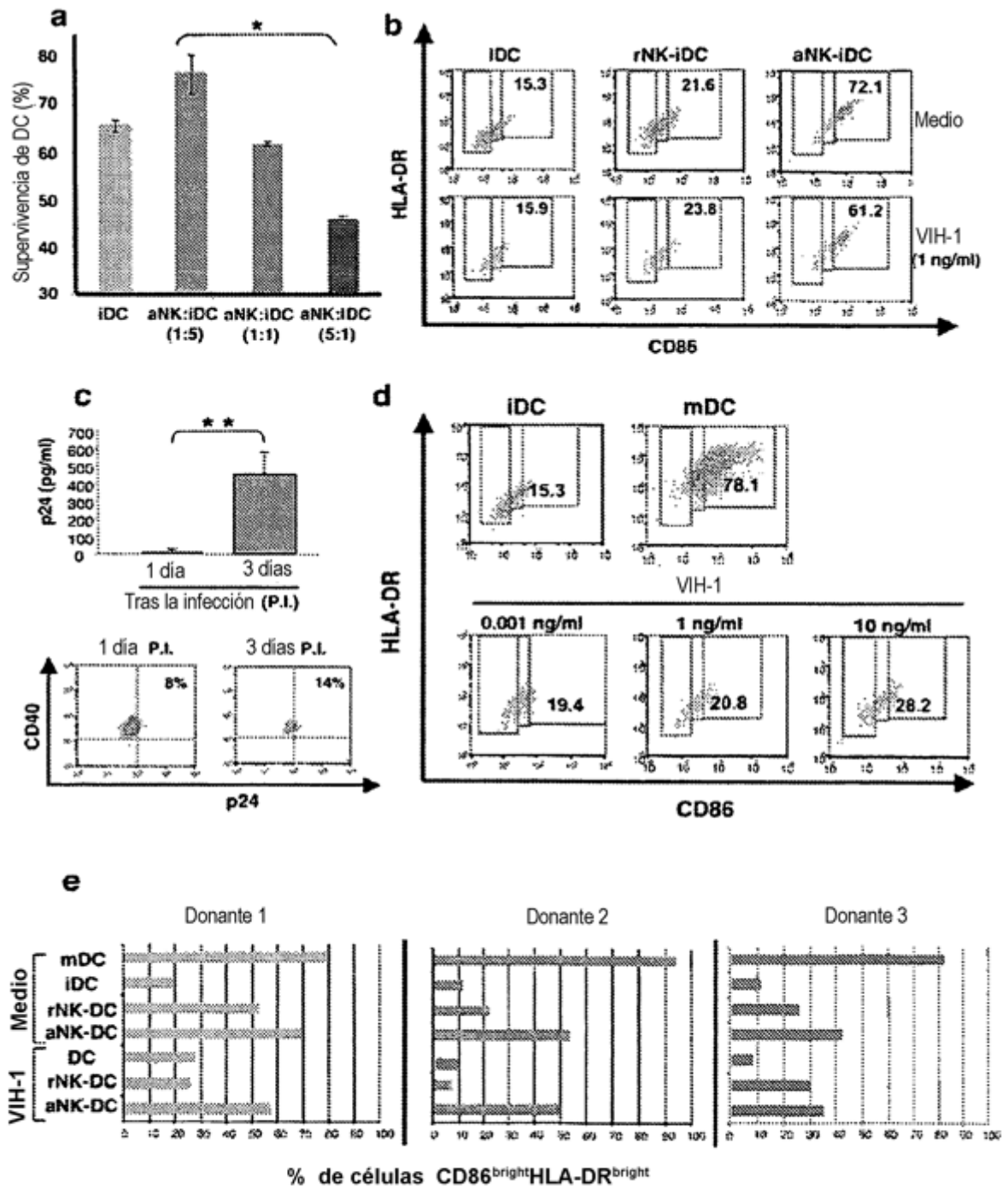


FIG. 1

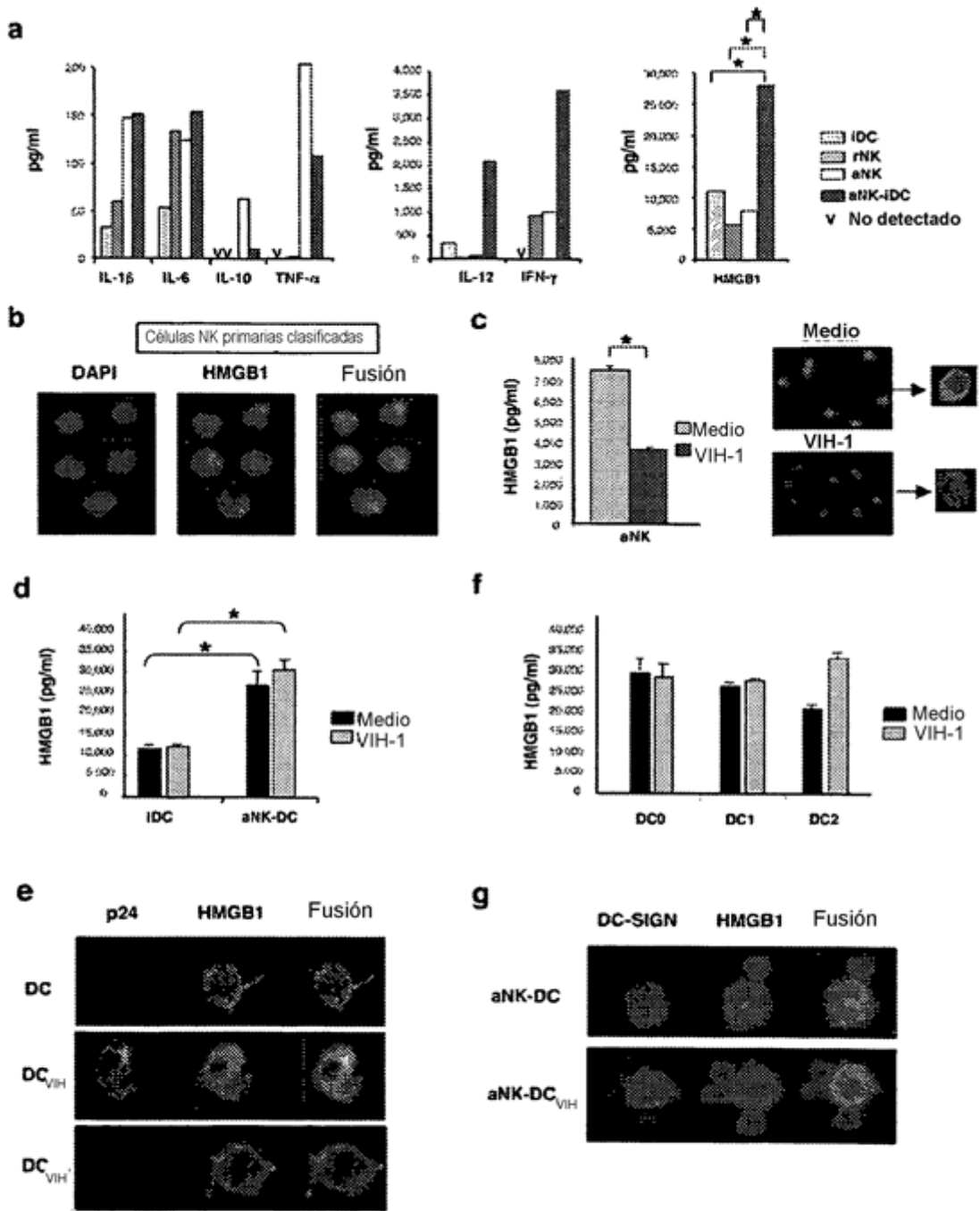


FIG. 2

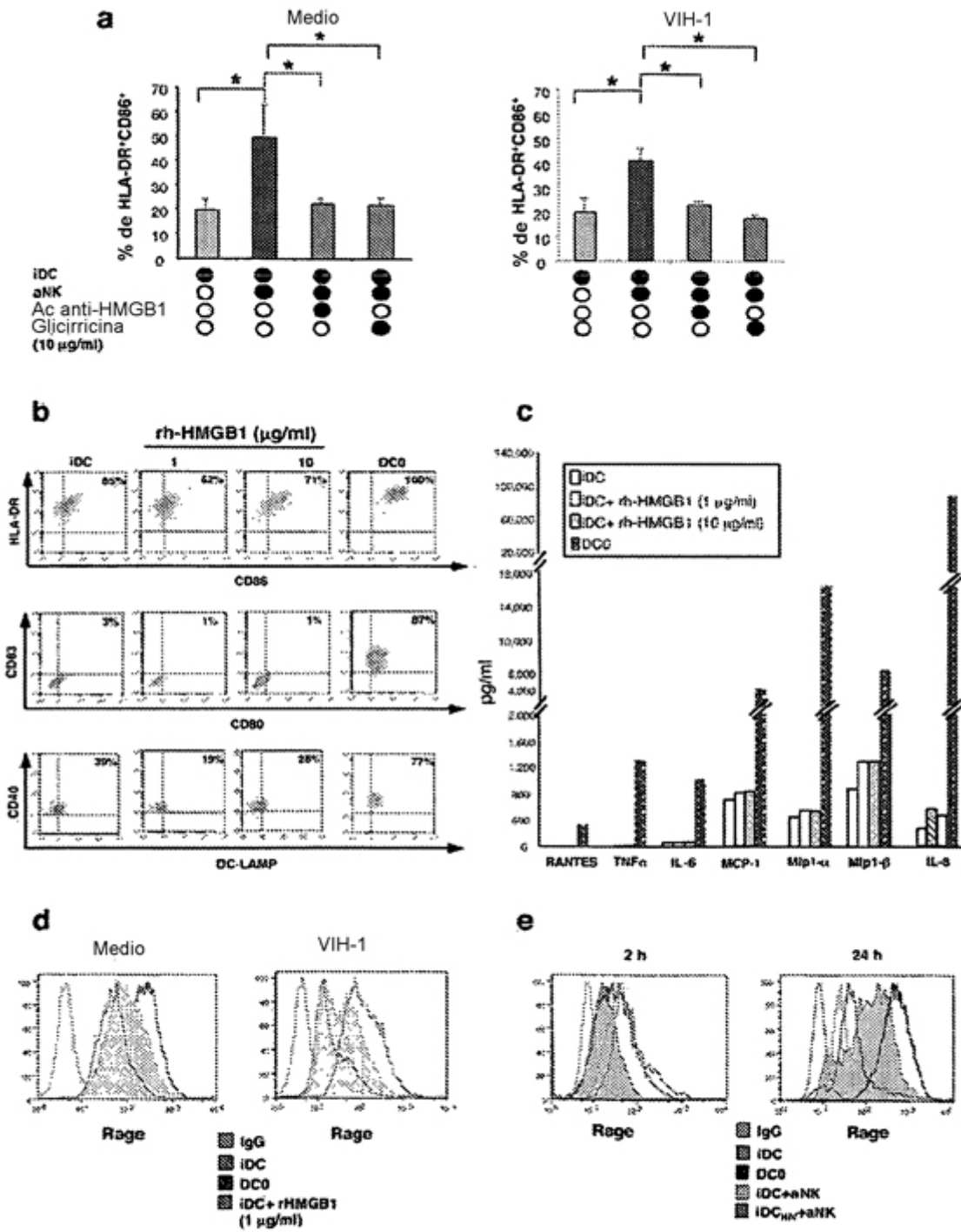


FIG. 3

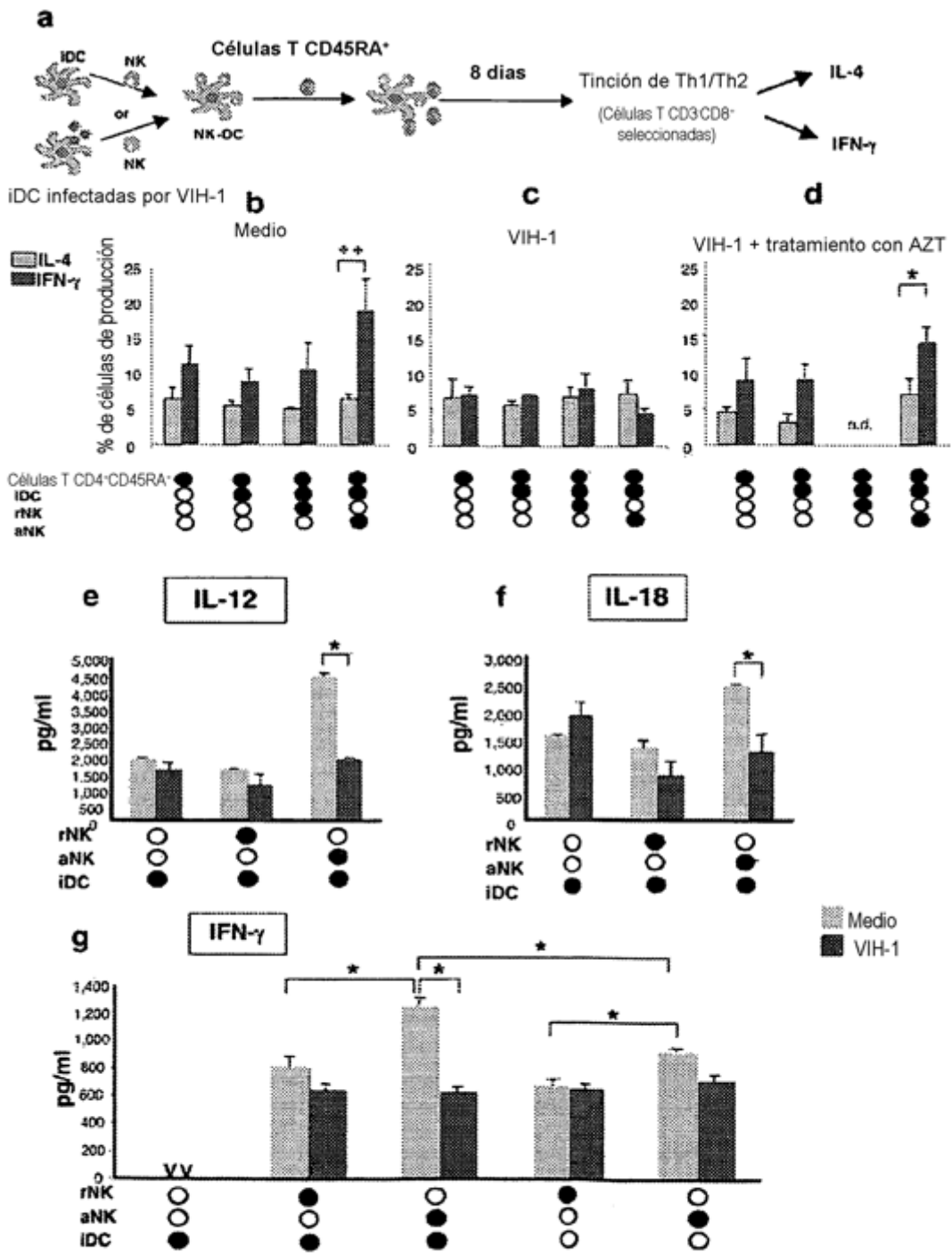


FIG. 4



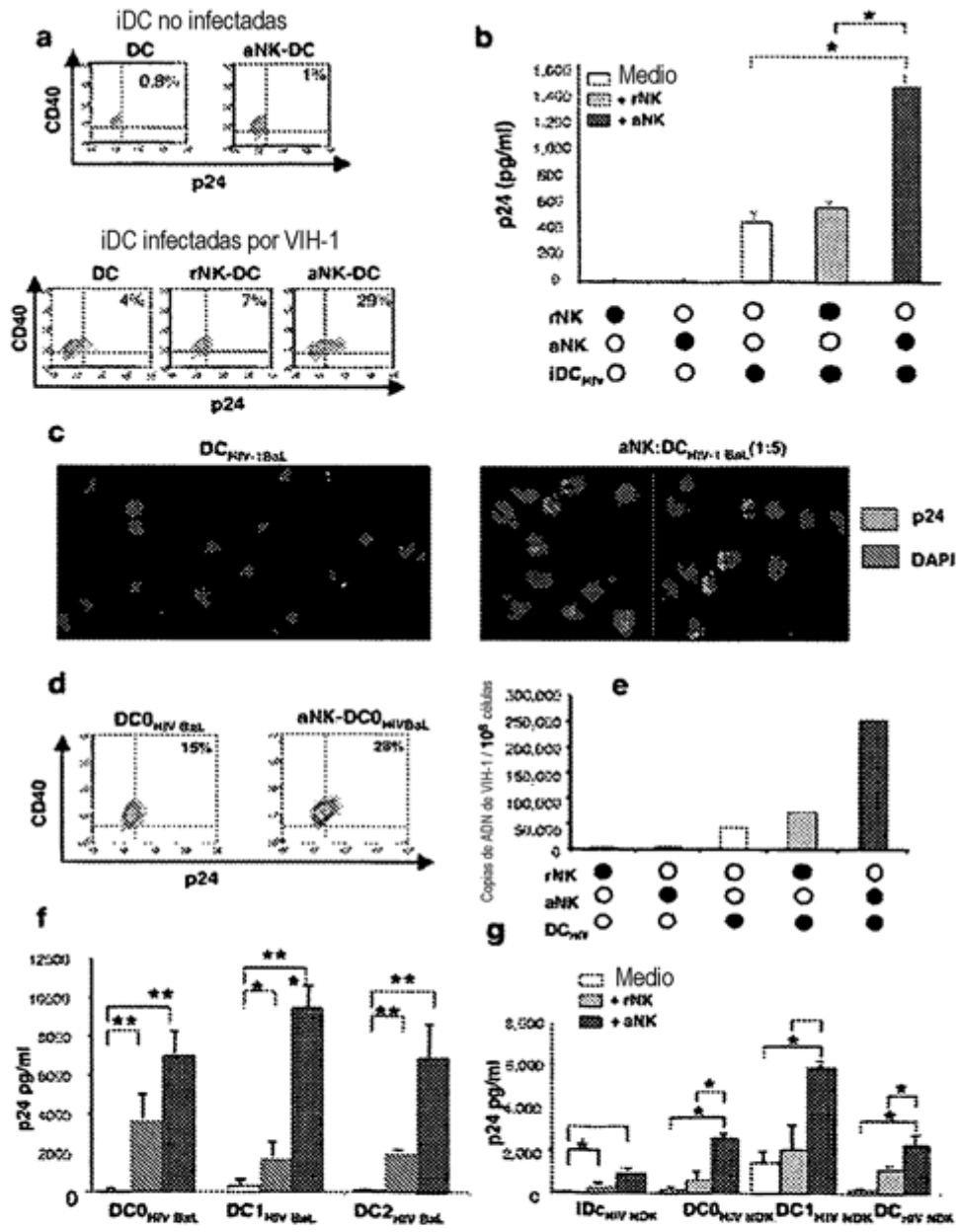


FIG. 5

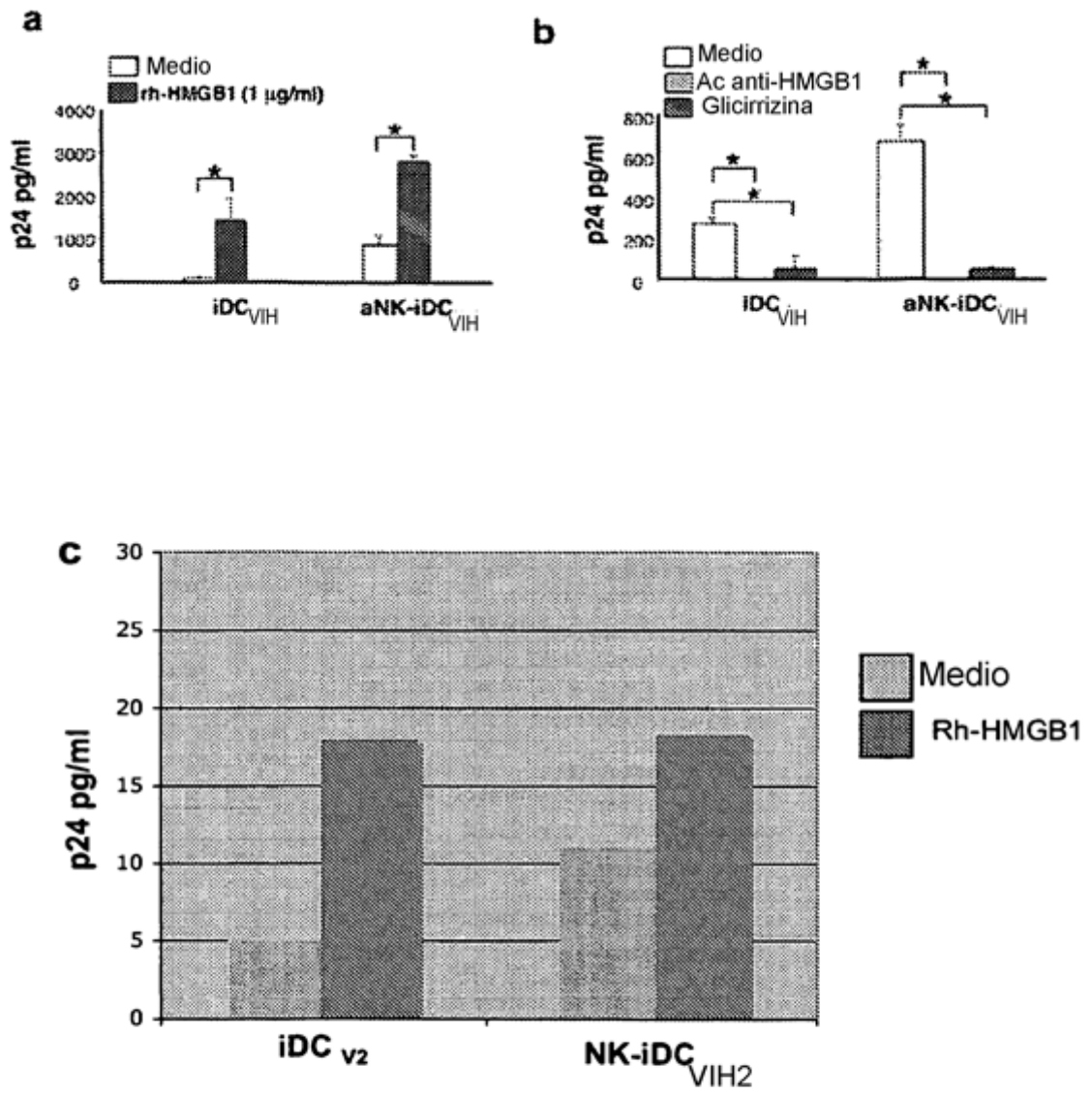


FIG. 6

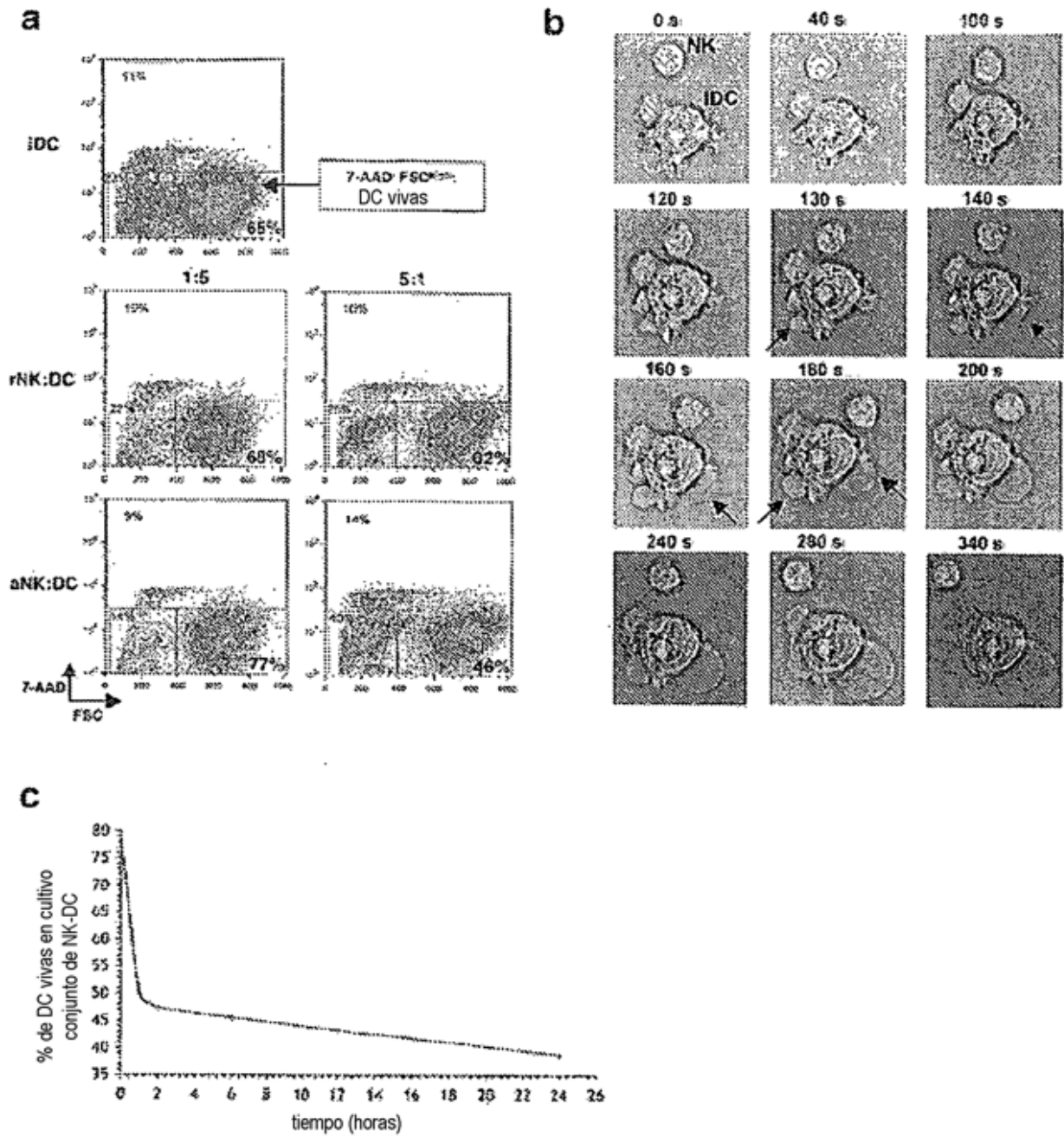


FIG. 7

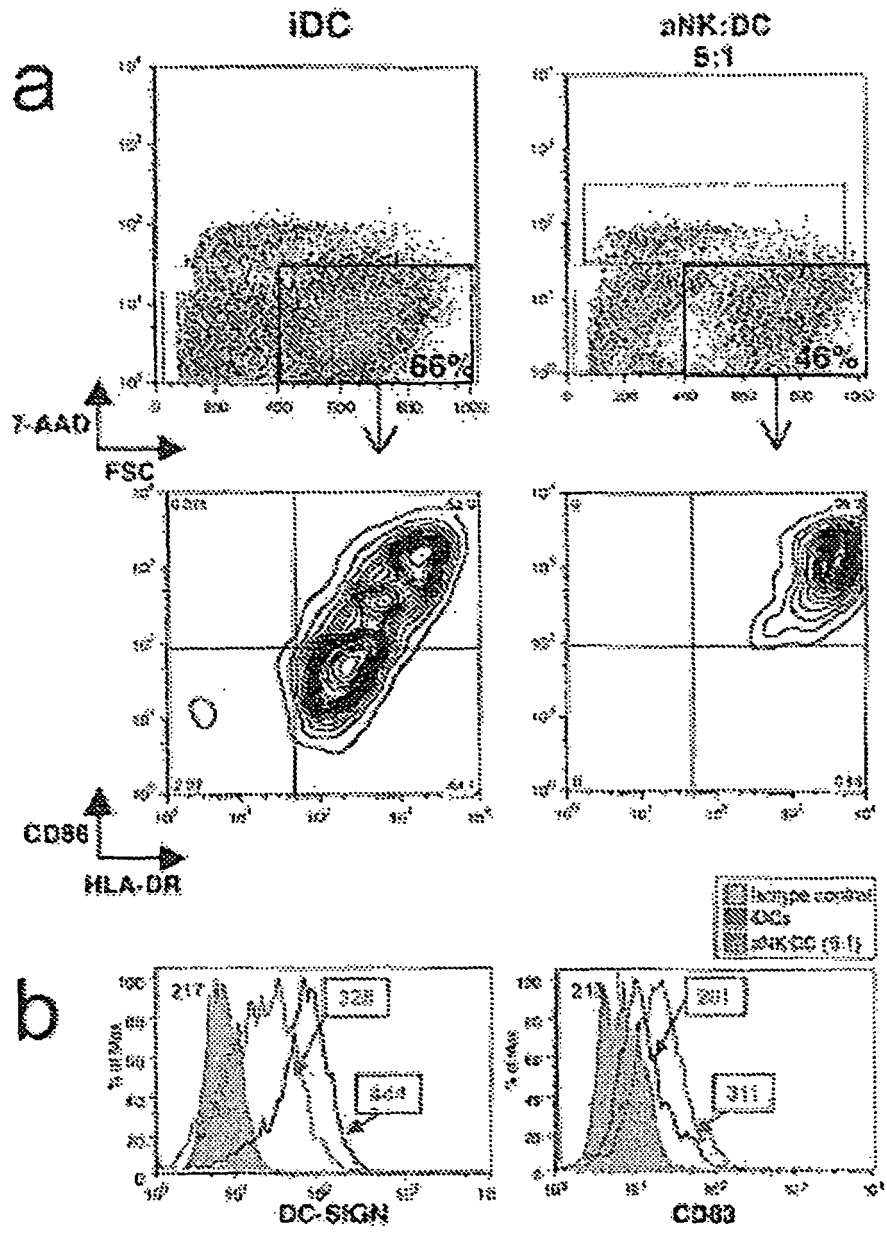
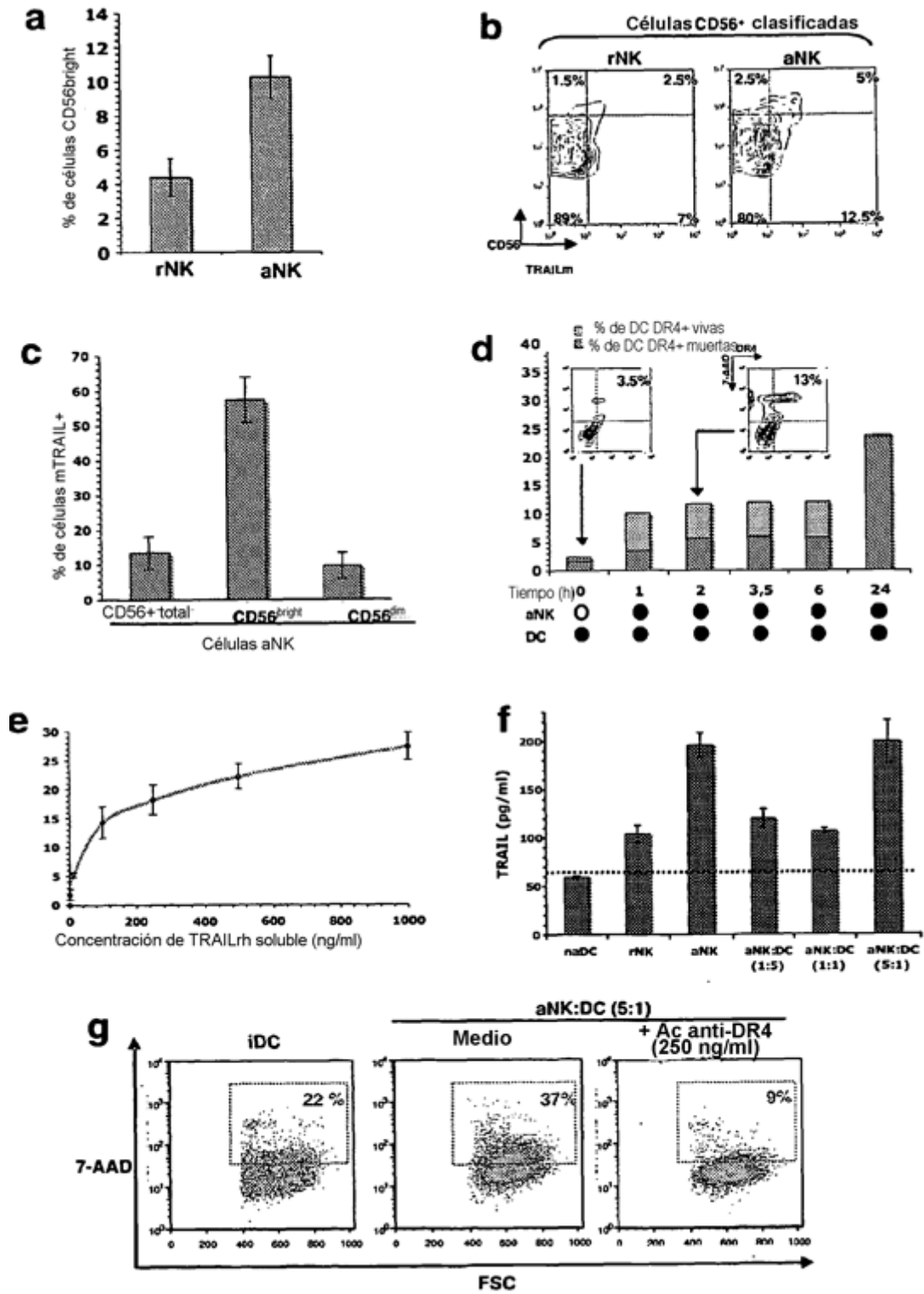


FIG. 8



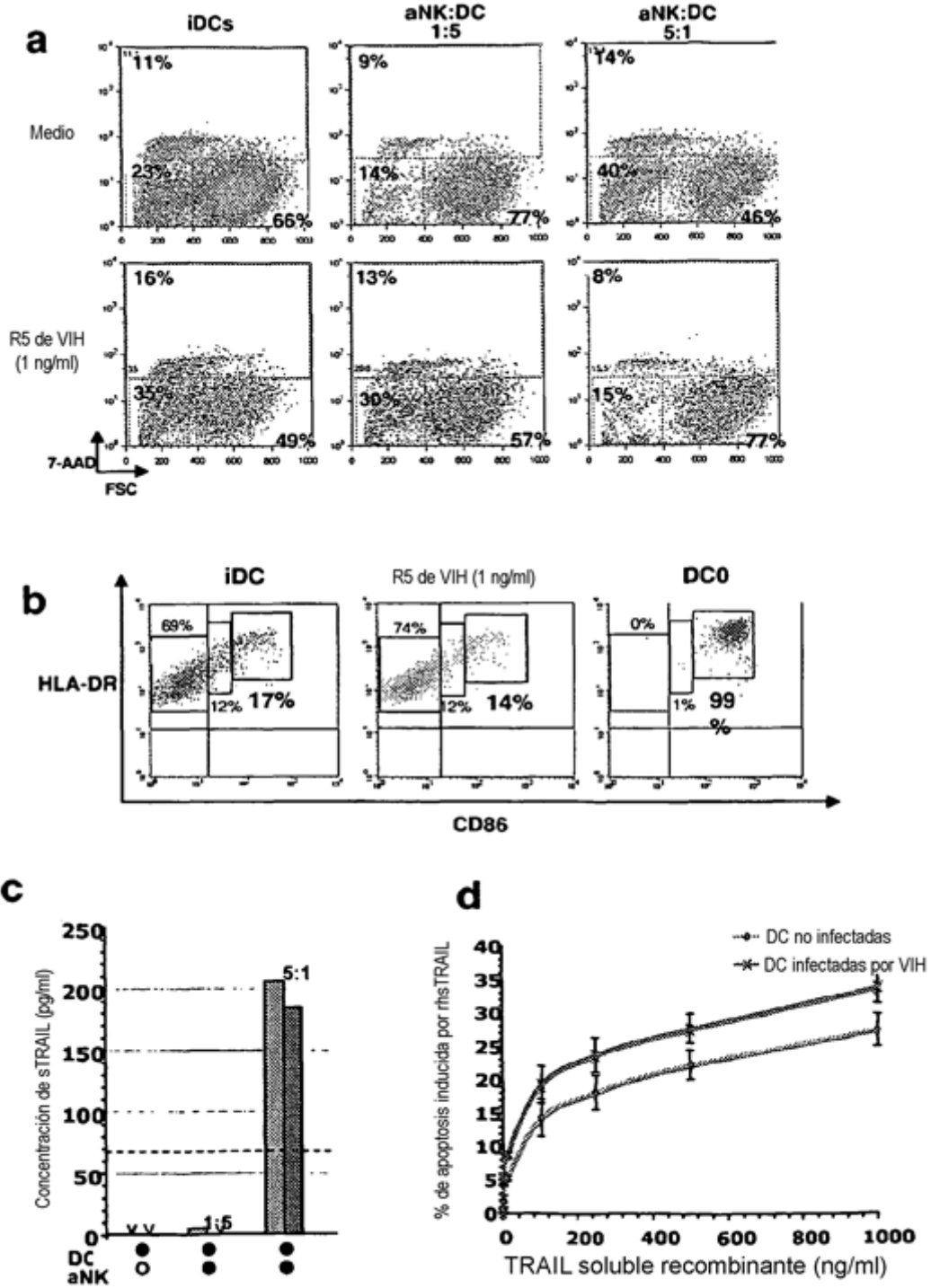


FIG. 10

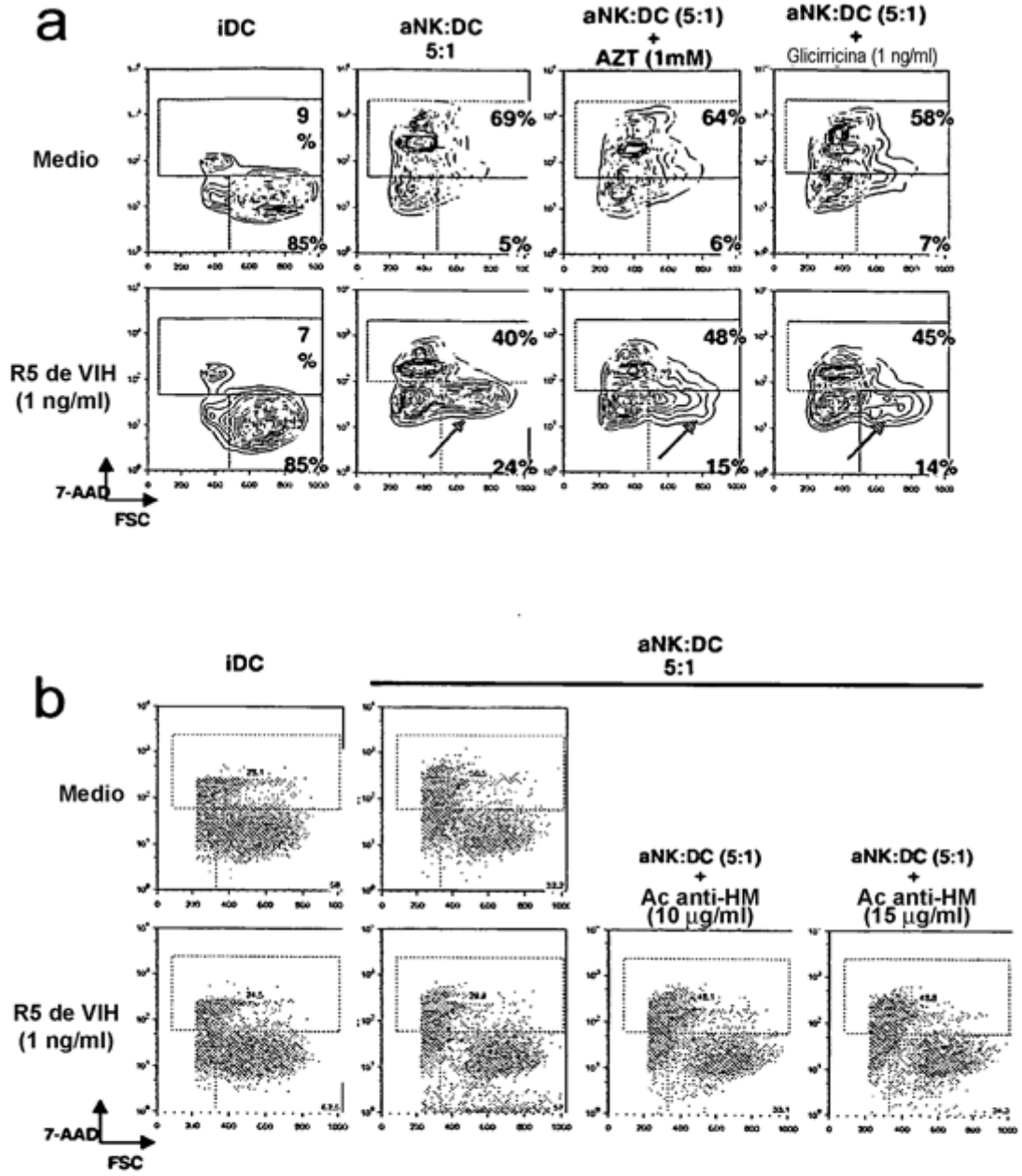


FIG. 11

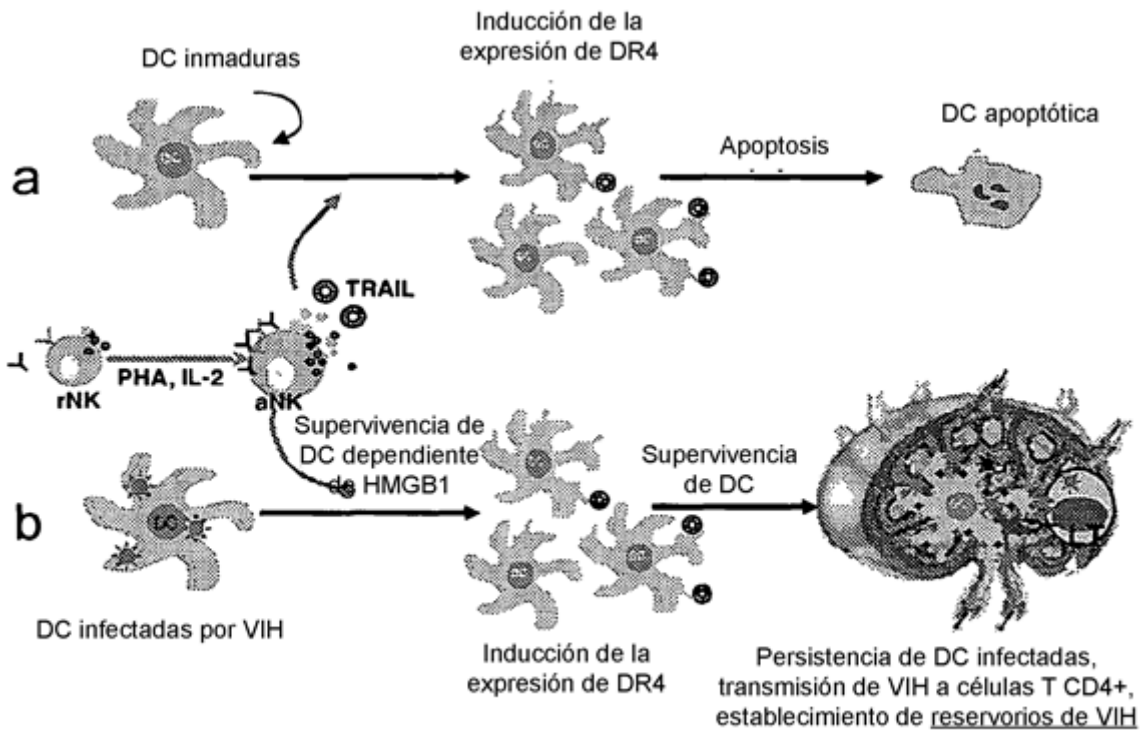


FIG. 12

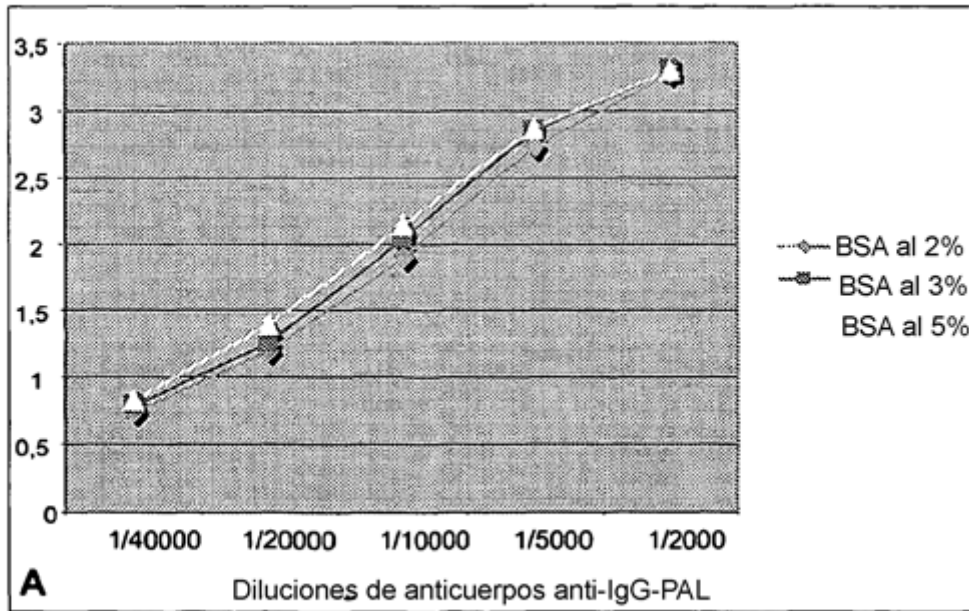


FIG. 13



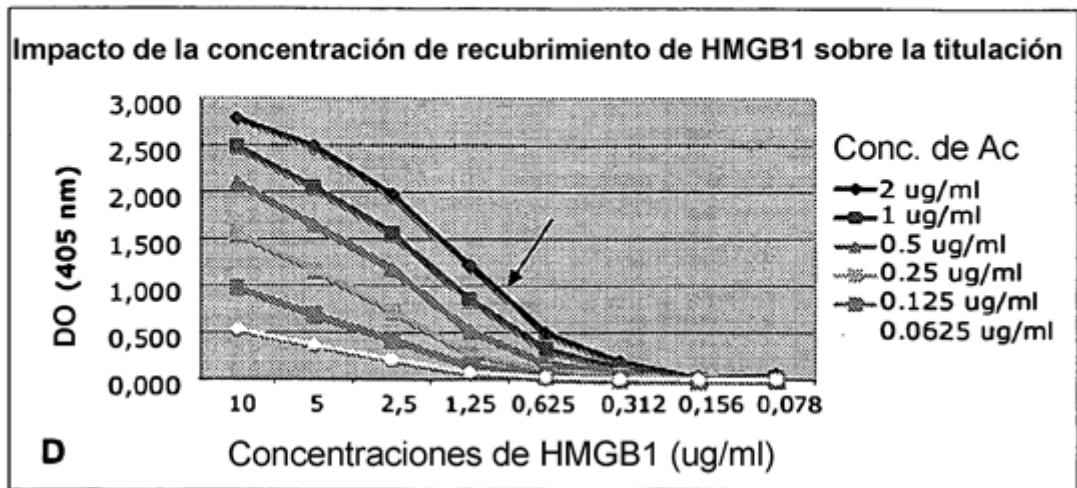
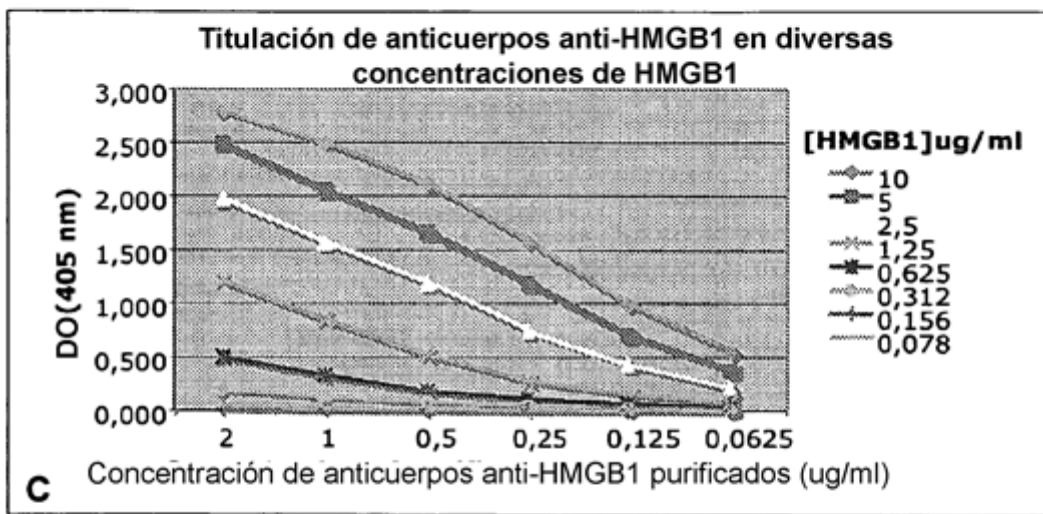
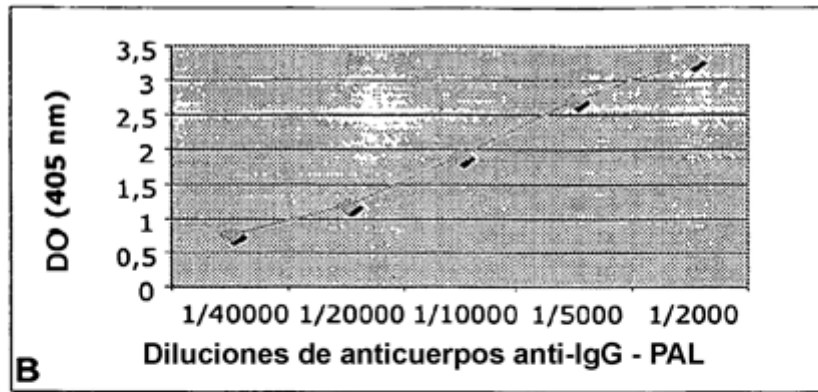


FIG. 13

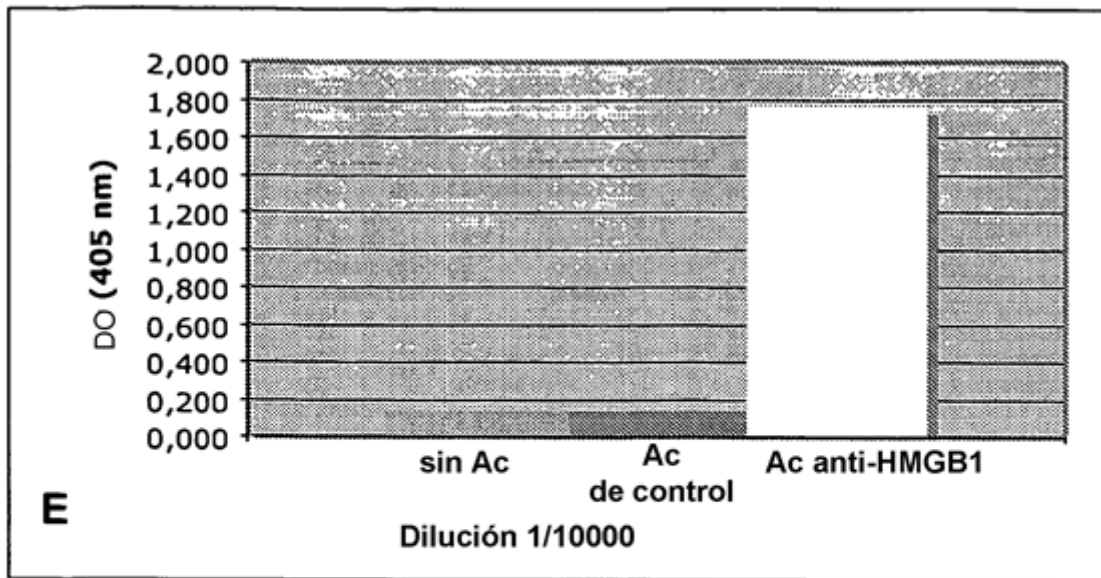


FIG. 13

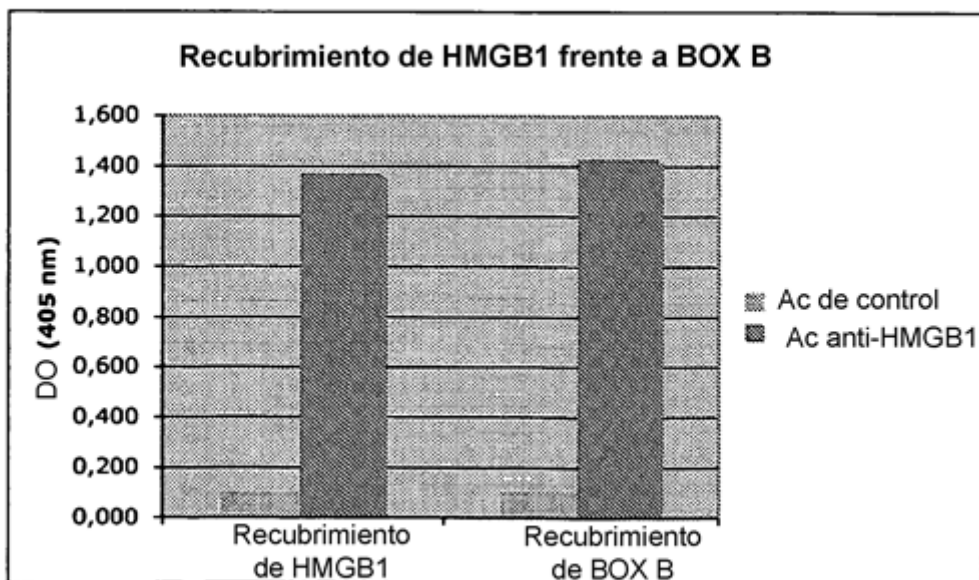


FIG. 14

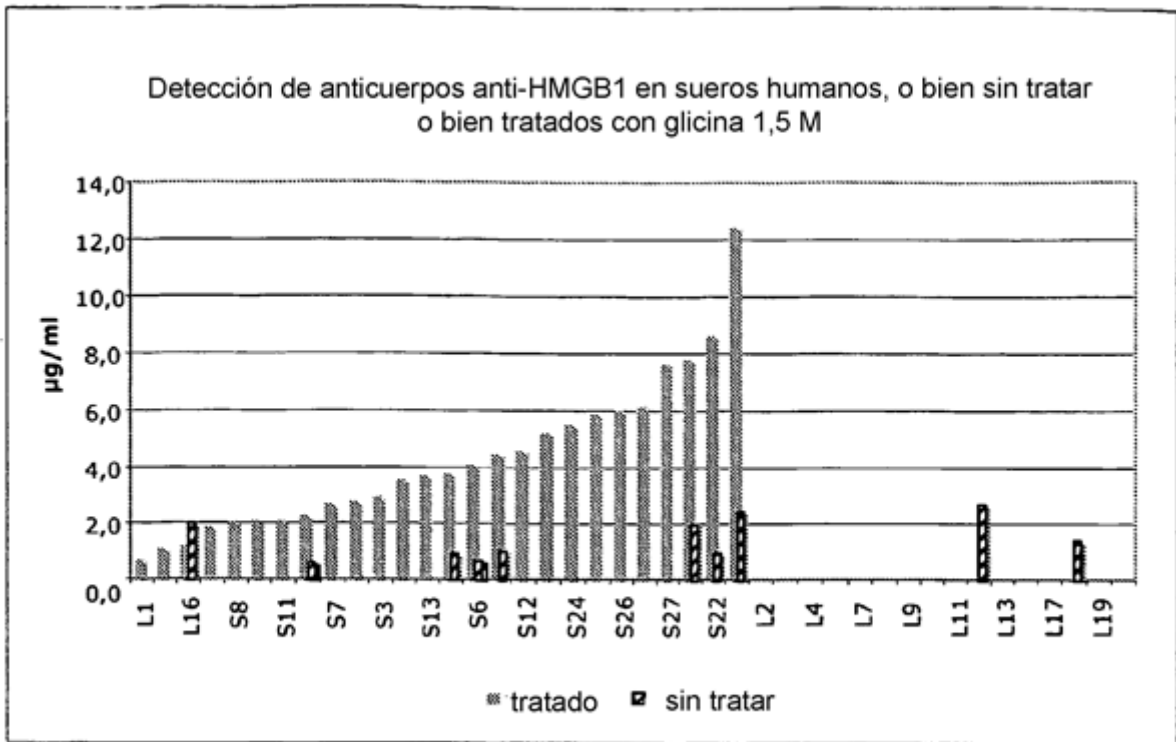


FIG. 15

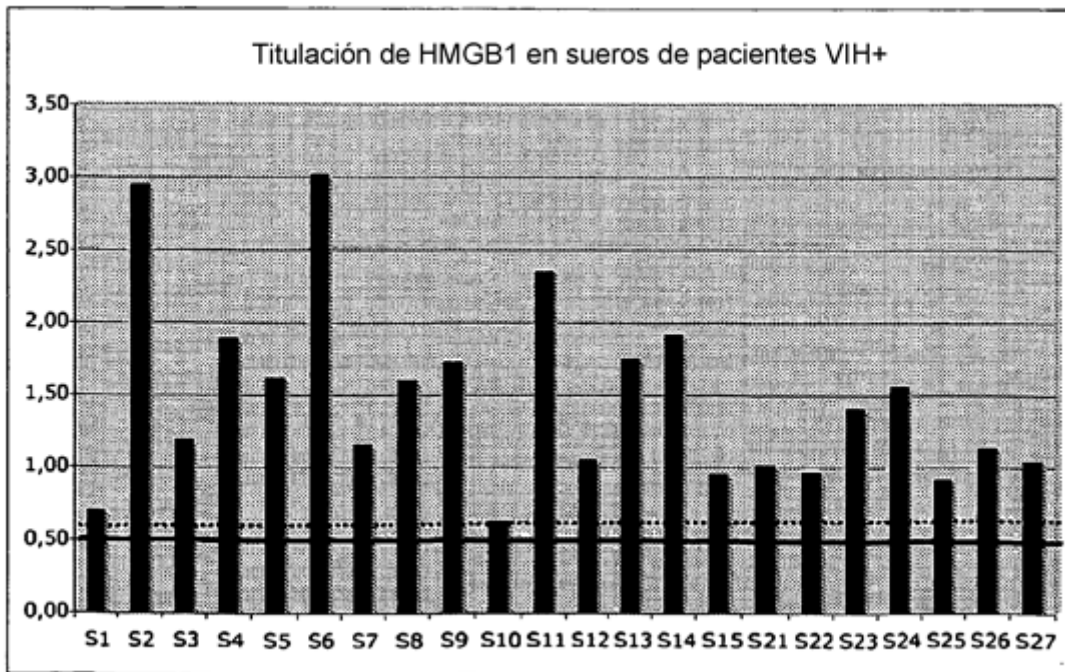


FIG. 16

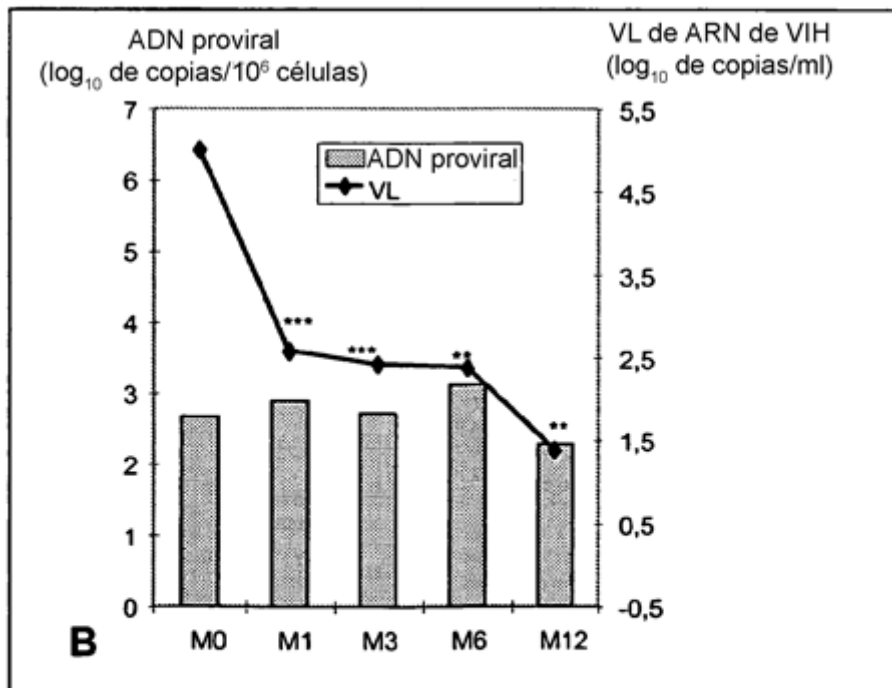
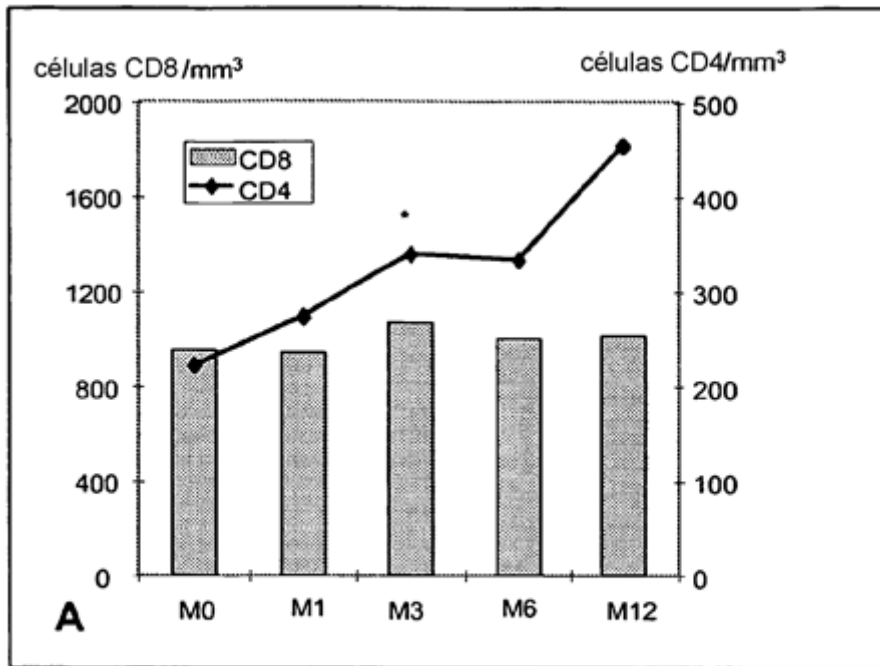


FIG. 17

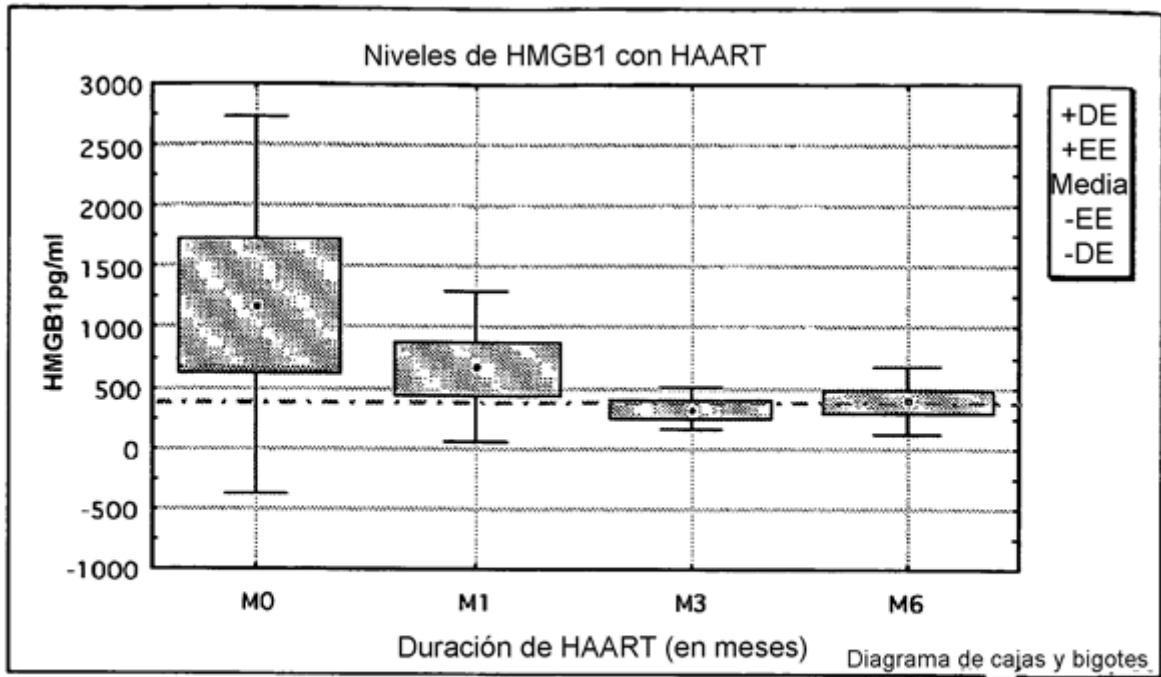


FIG. 18

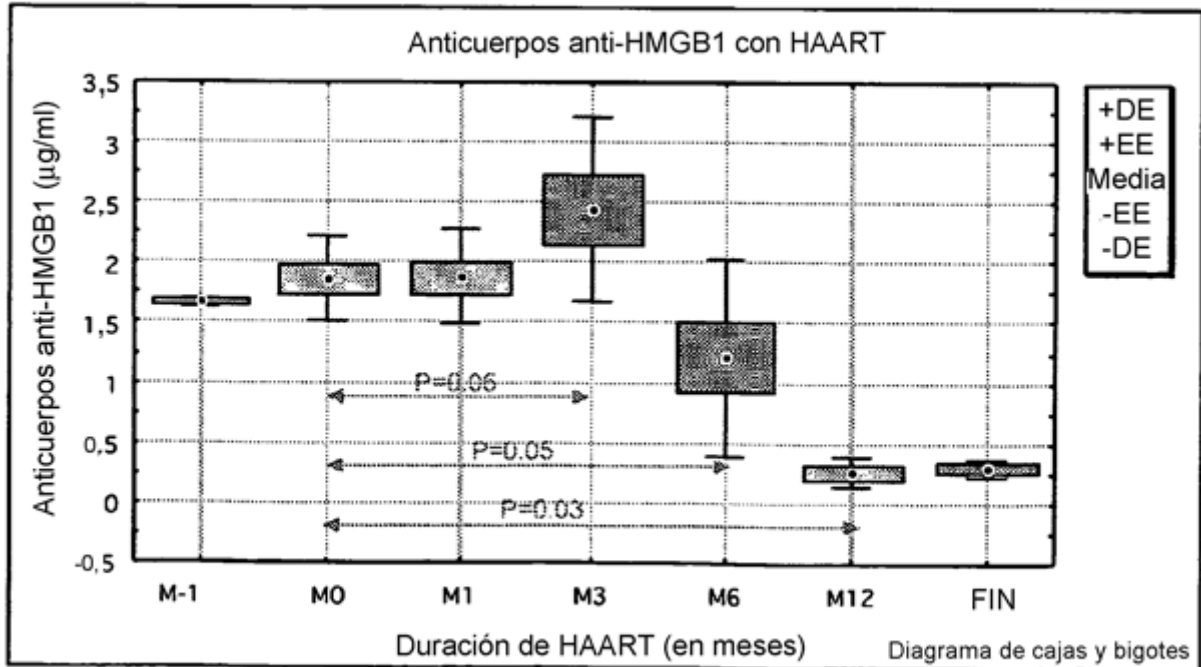


FIG. 19

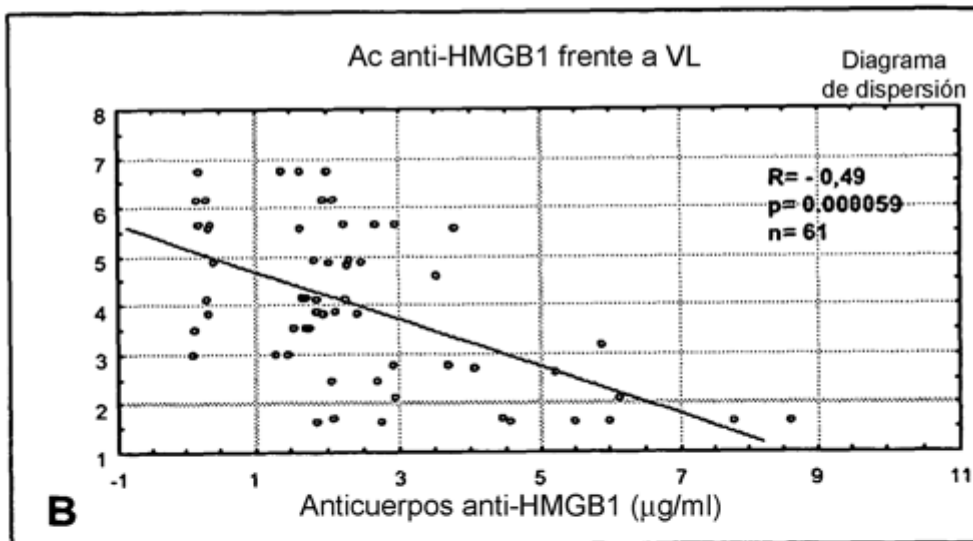
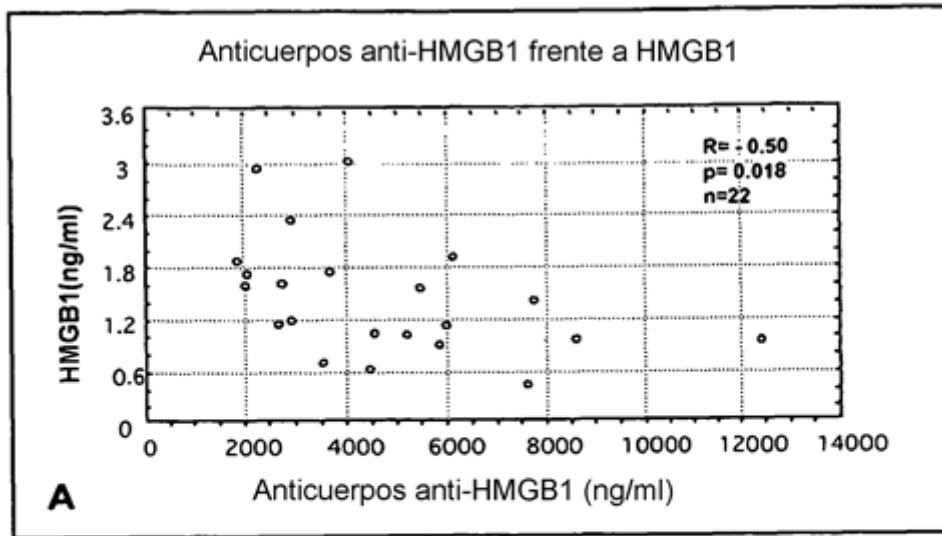


FIG. 20