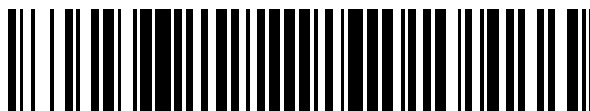


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 249**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2013 PCT/EP2013/056110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013 E 13711681 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2828656**

54 Título: **Método para seguir las respuestas de células T específicas al VIH**

30 Prioridad:

23.03.2012 EP 12382109

23.03.2012 US 201261615038 P

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

07.04.2020

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE
LA SIDA-CAIXA (100.0%)
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Carretera de Canyet, s/n
08916 Badalona (Barcelona), ES**

72 Inventor/es:

**RUIZ RIOL, MARTA;
BRANDER, CHRISTIAN y
IBARRONDO, JAVIER**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 753 249 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

Método para seguir las respuestas de células T específicas al VIH

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para seguir las repuestas de células T específicas al VIH e identificar sujetos capaces de controlar la progresión de VIH o prevenir la infección por VIH en conjunto.

10 **Antecedentes de la invención**

La diversidad de secuencias del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es uno de los obstáculos principales para la evaluación fiable de la inmunidad antivírica de células T in vitro y para el diseño de una vacuna eficaz contra el VIH ampliamente aplicable. Véase, Brander C, *et al.*, Curr. Opin. Immunol. 2006; 18(4):430-437.

15 A pesar de la extensa diversidad de secuencias del VIH a nivel del genoma completo, la variación en posiciones individuales de las proteínas víricas con frecuencia está restringida a un número limitado de sustituciones de aminoácidos que se repiten o "alternan" a lo largo de los diferentes clados de VIH. Véase, Gaschen B, *et al.*, Science 2002; 296:2354-2360. Los residuos que alternan con frecuencia incluyen pares de aminoácidos tales como arginina (R) por lisina (K) o leucina (L) por valina (V), que son bioquímicamente similares y, por tanto, es probable que sean tolerados por el virus sin impactos serios en su eficacia de replicación. Notablemente, la mayor parte de las mezclas de péptidos con variaciones (péptidos "toggle") de Gag p24 -representativas de una proteína muy conservada- solo requieren menos de 20 variantes (mediana 4), incluso en el nivel más alto de cobertura de la secuencia (es decir, solo se excluyen los aminoácidos presentes en <5 % de las secuencias de bases de datos de las posiciones con variaciones), mientras que el número de variantes es mayor en otras subunidades de Gag a esta cobertura. Véase, Yusim K, *et al.*, J. Virol. 2002; 76(17): 8757-8768. En un ensayo Elispot de IFN- γ , se mostró que estos péptidos "con variaciones" detectan respuestas de células T CD4+ y CD8+ específicas para VIH de amplitud y magnitud significativamente mayor que péptidos consenso coincidentes. Véase, Frahm N, *et al.*, J. Immunol. 2007; 179:6638-6650.

30 La mayoría de los estudios de candidatos de inmunógenos para la vacunación contra VIH se basan en el análisis de la producción de IFN- γ por Elispot. Hasta ahora, no se ha encontrado una correlación directa entre la magnitud o secreción de IFN- γ y la carga vírica. Durante los últimos años, se ha mostrado que la calidad de las respuestas de las células T contra determinantes antigénicos del VIH puede ser uno de los determinantes claves en la inducción de una respuesta eficaz contra el virus. Sin embargo, el análisis de respuestas polifuncionales (por ejemplo, secreción de diferentes citocinas y citólisis mediada por perforina) de linfocitos T CD8+ en pacientes infectados con VIH ha mostrado una correlación negativa entre la capacidad de polifuncionalidad de los linfocitos T y la carga vírica. Por otro lado, la citometría de flujo y los análisis basados en Elispot pueden no detectar respuestas asociadas a citocinas que no se miden regularmente o que no muestran el/los perfil(es) de función efectora esperada. Por consiguiente, hay una necesidad en la técnica para métodos más sensibles y completos para evaluar la respuesta de células T contra el VIH.

45 En conexión con lo anterior, Legrand *et al.* (PLOS ONE, 2006, vol. 1, n.º 1, E102, págs. 1-10) dan a conocer respuestas inmunitarias de células T específicas al VIH-1 en niños no infectados expuestos al VIH-1 (es decir, seronegativos después de exposición), en donde dichas respuestas se analizan mediante un método en donde las citocinas IFN- γ e IL-2 se miden conjuntamente. Además, Lamoreaux *et al.* (Nature Protocols, 2006, vol. 1 n.º 3, págs. 1507-1516) enseña una combinación de marcadores con respecto a un fluorocromo de manera que pueden detectarse diferentes marcadores en el mismo canal de fluorescencia.

50 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a un método para ensayar la respuesta de células T específica contra un patógeno en un sujeto que comprende: i) poner en contacto una muestra que comprende células T del sujeto con una composición que comprende un antígeno del patógeno y ii) determinar los niveles de una pluralidad de citocinas producidas por las células T en la muestra, en donde la pluralidad de citocinas se determinan mediante citometría de flujo aumentada, comprendiendo dicha citometría de flujo aumentada detectar, al mismo tiempo, varias citocinas en el mismo canal de fluorescencia, en donde la pluralidad de las citocinas consiste en citocinas características de una respuesta Th1 y citocinas características de una respuesta Th2, en donde las citocinas características de la respuesta Th1 son IFN- γ , TNF- α , MIP1- β e IL-2 y en donde las citocinas características de la respuesta Th2 se seleccionan del grupo que consiste en IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13.

Breve descripción de las figuras

65 Figura 1. Respuestas celulares asociadas a la estimulación con péptidos con variaciones solo. Los pacientes de VIH mostraron respuestas mayores, en términos de amplitud y magnitud que en individuos HEPS. No se observaron

diferencias estadísticas significativas entre los grupos controlador y no controlador. También se detectaron menos respuestas y más débiles en el grupo HEPS.

5 Figura 2. Histogramas (arriba: números absolutos y abajo porcentajes relativos) que muestran las diferentes respuestas detectadas en pacientes HEPS e infectados con VIH (controladores y no controladores) cuando se usan los enfoques de Elispot de INF- γ y citometría de flujo aumentada. Además todas las respuestas de citometría de flujo aumentada (izquierda), las dirigidas por linfocitos CD3 o solo células T CD4 y CD8 también se dividen entre respuestas de tipo Th1 (medio) y respuestas Th2/17 (derecha). Comparación entre ensayos "Blow" y ELISpot de INF- γ . Se detectaron significativamente más respuestas con el ensayo "Blow" comparado con el ensayo de INF- γ .
10 Además de una respuesta de CD8 general, el ensayo "Blow" reconoció respuestas de tipo Th1 y Th2 específicas contra péptidos con variaciones en las poblaciones de células T CD8 y CD4. El índice de detección aumentado fue particularmente pronunciado en el grupo HEPS.

15 Figura 3. A-B: Respuestas "Blow" de CD8 y CD4. Los pacientes infectados con VIH generaron en su mayor parte respuestas de CD8, mientras que la población HEPS montó una respuesta de células T CD4 mayor. El perfil de respuestas en controladores y no controladores de VIH y sujetos HEPS varió ampliamente en sus patrones de Th1 frente a Th2/IL-17 y sus capacidades de desgranulación, tanto para células T CD4 como CD8. A diferencia de los individuos infectados por VIH, las respuestas de células T CD8 en sujetos HEPS fueron con frecuencia productoras de citocinas (Th1+ y Th2/17) pero no de desgranulación (CD107-). Sin embargo, los perfiles de Th2 frecuentes observados en esta población pudieron estar sesgados por la inclusión de IL-17 en el mismo panel.
20

Figura 4. A-D: La producción de citocinas individuales se evaluó por citometría de flujo. La desconvolución de flow-cytomix mostró un número mayor de respuestas en sujetos HEPS comparados con individuos VIH+ (además el grupo controlador produjo más respuestas que el grupo no controlador). También se detectaron niveles elevados de citocinas individuales (con significación estadística para IL-1b, IL-10, IL-13 e IL-22) en sujetos HEPS comparado con individuos VIH+.
25

Figura 5. Estrategia de selección de poblaciones para citometría de flujo "aumentada" (B-flow). Ejemplo representativo de una estrategia de selección de poblaciones para células T cooperadoras CD4 y respuestas de LTC tras la estimulación de péptidos con variaciones (véase la sección de procedimiento general).
30

Figura 6. Porcentaje de respuestas de células T CD8 (arriba) y células T CD4 (abajo) generadas tras diferentes estimulaciones en 3 HEPS (parejas serodiscordantes: EAR28, EAR05 y EAR33). Estimulaciones: PMA+I_o (estimulación policlonal), conjunto 1 de VEB (péptidos restringidos a HLA de clase I), conjunto 4 de VEB (péptidos restringidos a HLA de clase II).
35

Figura 7. Porcentaje de respuestas de células T generadas tras diferentes estimulaciones en 2 HEPS (parejas serodiscordantes: EAR05 y EAR28): Estimulaciones: conjunto 1 de p24 de VIH, conjunto 3 de p24 de VIH, conjunto 1 de p17 de VIH, conjunto 2 de p17 de VIH, conjunto de Nef, conjunto 1 de VEB (péptidos restringidos a HLA de clase I), conjunto 4 de VEB (péptidos restringidos a HLA de clase II), PMA+I_o (estimulación policlonal).
40

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención divulga un método nuevo para ensayar una respuesta celular contra VIH. El método se basa en el uso combinado de citometría de flujo "aumentada" ("Blow", del inglés "boosted flow cytometry") y péptidos con variaciones. El análisis "Blow" combina varias citocinas en el mismo canal de fluorescencia y por tanto puede cubrir un conjunto mucho mayor de funciones efectoras que los ensayos estándar.

50 La combinación de péptidos con variaciones con el nuevo análisis por "blow" y la determinación de un amplio espectro de citocinas en sobrenadantes proporciona una herramienta poderosa para una evaluación más completa de la inmunidad de células T específica de VIH, en general, y hace posible definir diferencias funcionales entre pacientes de VIH que controlan y no controlan la infección. La invención podría ser particularmente útil en la detección de funciones efectoras y respuestas potencialmente "no clásicas" en individuos vacunados, tal como con vacunas de células dendríticas, y en sujetos muy expuestos persistentemente seronegativos (HEPS).
55

Sorprendentemente, la estimulación de las PBMC de un paciente con un péptido de Gag p24 o Gag p17 o Nef, o con un antígeno de VEB, preferiblemente un péptido con variaciones, en combinación con la determinación de los niveles de citocinas por citometría de flujo aumentada, es un método mucho más sensible para detectar respuestas de linfocitos T específicas que los otros métodos descritos en la técnica tal como el ELISpot clásico de INF- γ .
60

Los inventores han observado que, sorprendentemente, la estimulación de PBMC de un paciente con una población de variantes peptídicas de Gag p24 o Gag p17 o Nef, o con una población de variantes antigénicas de VEB, preferiblemente un péptido con variaciones, y la determinación de los niveles de citocinas por citometría de flujo aumentada, es un método mucho más sensible para detectar respuestas de linfocitos T específicas que el ELISpot clásico de INF- γ . Este segundo método de la invención es específicamente sensible en detectar una respuesta de tipo Th1 en la población HEPS.
65

5 Los inventores también han observado que, sorprendentemente, la estimulación de PBMC de un paciente con una población de variantes de péptidos de Gag p24 o Gag p17 o Nef, o con una población de variantes de antígenos de VEB, preferiblemente un péptido con variaciones, y la determinación de los niveles de citocinas por citometría de flujo aumentada, es un método mucho más sensible para detectar respuestas de linfocitos T específicas que el ELISpot clásico de IFN- γ .

10 Los resultados de la presente invención llevaron a la conclusión de que la técnica de estimulación de PBMC con un péptido, seguida por detección de múltiples citocinas usando el método de citometría de flujo aumentada se puede aplicar a cualquier antígeno de patógeno capaz de inducir la producción de citocinas de PBMC.

15 Por último, la presente invención permite la determinación de respuestas específicas de péptidos en CD4 (péptidos de MHC de clase II) así como en CD8 (péptidos de MHC de clase I) y respuestas de captura contra VIH en HESN no observadas hasta ahora.

20 Por tanto, la invención se refiere a un método para ensayar la respuesta de células T específica contra un patógeno en un sujeto que comprende: i) poner en contacto una muestra que comprende células T de un sujeto con una composición que comprende un antígeno del patógeno, y ii) determinar los niveles de una pluralidad de citocinas producidas por las células T en la muestra, en donde los niveles de la pluralidad de citocinas se determinan mediante citometría de flujo aumentada, comprendiendo dicha citometría de flujo aumentada detectar, al mismo tiempo, varias citocinas en el mismo canal de fluorescencia, en donde la pluralidad de las citocinas consiste en citocinas características de una respuesta Th1 y citocinas características de una respuesta Th2, en donde las citocinas características de la respuesta Th1 son IFN- γ , TNF- α , MIP1- β e IL-2 y en donde las citocinas características de la respuesta Th2 se seleccionan del grupo que consiste en IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13.

25 En una forma de realización preferida, la composición que comprende un antígeno es un antígeno, más preferiblemente un único antígeno. En otra forma de realización, la composición que comprende un antígeno es una biblioteca de antígenos.

30 En una forma de realización preferida, el antígeno del patógeno es una variante peptídica derivada de un polipéptido del patógeno. En otra forma de realización preferida, la biblioteca de antígenos es una biblioteca de variantes peptídicas. En una forma de realización más preferida, la biblioteca de variantes peptídicas es un péptido con variaciones.

35 En otra forma de realización preferida de la invención, el patógeno es VIH o VEB.

40 En caso de que el método de la invención sea un método para ensayar la respuesta de células T específica contra un patógeno VIH, las variantes peptídicas derivan de la poliproteína Gag o de la proteína Nef. En una forma de realización preferida, dichas variantes peptídicas derivan de p24 o p17.

45 En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un método para ensayar la respuesta de células T específica contra un patógeno en un sujeto que comprende: i) poner en contacto una muestra que comprende células T de un sujeto con una biblioteca de variantes peptídicas derivadas de un polipéptido del patógeno, y ii) determinar los niveles de una pluralidad de citocinas producidas por las células T en la muestra.

50 En una forma de realización, el método de la invención comprende además determinar los niveles de citocinas características de una respuesta Th9, Th17 o Th22.

En otra forma de realización preferida del método de la invención las citocinas características de una respuesta Th1 y las citocinas características de una respuesta Th2 se determinan en células CD4+ y/o células CD8+.

55 En el método de la invención, se determinan los niveles de una pluralidad de citocinas por citometría de flujo aumentada. Se pueden usar varios controles positivos en citometría de flujo aumentada. En una forma de realización positiva, se usa PMA (12-miristato 13-acetato de forbol) + Io (ionomicina) como control positivo usando la técnica de citometría de flujo aumentada en HESN después de una estimulación policlonal. En otra forma de realización, se usa VEB como control positivo usando la citometría de flujo aumentada en HESN después de una estimulación monoclonal. La estimulación por VEB es específica de péptido y por tanto es más similar a una estimulación con péptidos de VIH. Además, se puede usar anti-CD3 más anti-CD28 o PMA (12-miristato 13-acetato de forbol) más ionomicina (Io) como controles positivos. Como controles positivos adicionales para estimulación con péptidos víricos, también se pueden usar el conjunto de péptidos restringido a MHC de clase I de VEB y el conjunto de péptidos restringido a MHC de clase II de VEB para estimulaciones de células T CD8 y células T CD4, respectivamente.

65 En una forma de realización preferida, la muestra que contiene células T es una preparación de PBMC.

En otro aspecto, la presente divulgación enseña un método para la identificación de un paciente muy expuesto

persistentemente seronegativo que comprende: i) incubar una muestra que contiene células T de dicho paciente con una composición de péptidos de VIH o VEB y ii) determinar los niveles de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-1b, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17 e IL-22, en donde el nivel de expresión aumentado de una o más de dichas citocinas con respecto a un valor de referencia es indicativo de que el paciente es un paciente muy expuesto persistentemente seronegativo.

En una divulgación preferida, la composición de péptidos de VIH comprende péptidos derivados de proteínas Gag p24 de VIH o Gag p7 de VIH. En una divulgación más preferida, los péptidos derivados de las proteínas Gag p24 de VIH o Gag p17 de VIH son péptidos con variaciones.

En una divulgación preferida, la muestra que contiene células T es una preparación de PBMC.

En otra divulgación preferida, el valor de referencia para cada citocina es el nivel de expresión de dichas citocinas en una muestra que contiene células T de un paciente infectado con VIH.

En otra divulgación preferida, la determinación de los niveles de citocinas se hace por análisis de citometría de flujo. En una divulgación preferida, el análisis de citometría de flujo es una citometría de flujo aumentada.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit que comprende reactivos para la detección de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-1b, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17 e IL-22. En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de un kit de la invención para la identificación de una paciente HEPS según las características del método.

En otro aspecto, la presente divulgación enseña un método para la identificación de un paciente muy expuesto persistentemente seronegativo que comprende: i) incubar una muestra de dicho paciente que comprende células T con una composición de péptidos derivados de una proteína de VIH o de VEB y ii) determinar la respuesta de tipo Th1, la respuesta de tipo Th2 o la respuesta de tipo Th17, en donde una respuesta de tipo Th1, de tipo Th2 o de tipo Th17 aumentada en dichas células con respecto a un valor de referencia es indicativa de que el paciente es un paciente muy expuesto persistentemente seronegativo.

En una divulgación preferida la respuesta de tipo Th1 se determina midiendo los niveles de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IFN- γ , TNF- α , MIP1- β , e IL-2; la respuesta de tipo Th2 se determina midiendo los niveles de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-4 e IL-10; o la respuesta de tipo Th17 se determina midiendo los niveles de Th17 (IL-17). En una divulgación más preferida, la determinación de los niveles de citocinas se determina por citometría de flujo aumentada en linfocitos T CD4 y CD8.

En una divulgación preferida del método para la identificación de un paciente muy expuesto persistentemente seronegativo, la proteína de VIH es p24 o p17. En otra divulgación preferida, la proteína de VIH es p17. En una divulgación más preferida, la composición de péptidos es una mezcla de péptidos con variaciones.

Por tanto, en otra divulgación preferida, el método para la identificación de un paciente HEPS comprende incubar una muestra de dicho paciente con un péptido derivado de la proteína de VIH Gag p24 o la proteína de VIH p17 y determinar los niveles de citocinas de tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α , MIP1- β , IL-2), de tipo Th2 (IL-4, -10) y Th17 (IL-17) por citometría de flujo aumentada en linfocitos T CD4 y CD8, en donde un nivel de expresión aumentado de cualquiera de dichas citocinas en linfocitos T CD4 con respecto a un valor de referencia es indicativo de que el paciente es un HEPS.

En una divulgación preferida del método para la identificación de un paciente muy expuesto persistentemente seronegativo, la muestra que contiene células T es una preparación de PBMC.

En una divulgación preferida del método para la identificación de un paciente muy expuesto persistentemente seronegativo, el valor de referencia es el nivel de respuesta de tipo Th1, la respuesta de tipo Th2 o la respuesta de tipo Th17 en una muestra que contiene células T de un paciente infectado.

1. Definiciones

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

El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula capaz de provocar una respuesta inmune. Los antígenos incluyen pero no están limitados a células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos, hidratos de carbono, virus y extractos

víricos y organismos multicelulares tal como parásitos y alérgenos. El término antígeno incluye ampliamente cualquier tipo de molécula que es reconocida por un sistema inmunitaria huésped como que es exógena.

El término “terapia antirretroviral” o “TAR”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de uno o más fármacos antirretrovirales para inhibir la replicación del VIH. Típicamente, TAR implica la administración de al menos un agente antirretroviral (o, comúnmente, una mezcla de antirretrovirales) tales como inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico (por ejemplo, zidovudina (AZT), lamivudina (3TC) y abacavir), inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico (por ejemplo, nevirapina y efavirenz) e inhibidor de proteasa (por ejemplo, indinavir, ritonavir y lopinavir). El término terapia antirretroviral de gran actividad (“TARGA”) se refiere a pautas de tratamiento diseñadas para suprimir enérgicamente la replicación vírica y evolución de la enfermedad de VIH, que consisten habitualmente en tres o más fármacos diferentes, tal como, por ejemplo, dos inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos y un inhibidor de proteasa.

El término “citometría de flujo aumentada” o “blow” (del inglés “boosted flow cytometry”), como se usa en el presente documento, se refiere a un ensayo basado en la detección de varias citocinas en el mismo canal de fluorescencia por citometría de flujo, lo que cubre así un conjunto más amplio de funciones efectoras que los ensayos estándar.

El término “células T CD4(+)” como se usa en el presente documento se refiere a células T que presentan un correceptor CD4 en su superficie. El término se refiere a células T auxiliares, que o bien orquestan la activación de macrófagos y células T CD8+ (células Th-1), la producción de anticuerpos por células B (células Th-2) o que se ha pensado que desempeñan un papel esencial en enfermedades autoinmunes (células Th-17). Además, el término “células T CD4+” también se refiere a células T reguladoras, que representan aproximadamente el 10 por ciento de la población total de células T CD4+. Las células T reguladoras desempeñan un papel esencial en la amortiguación de las respuestas inmunes, en la prevención de enfermedades autoinmunes y en la tolerancia oral.

El término “células T CD8(+)” indica células T que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie, en donde la glicoproteína CD8 (grupo de diferenciación 8) es una glicoproteína transmembrana que sirve como un correceptor para el receptor de células T (TCR). De forma similar a TCR, CD8 se une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), pero es específica para la proteína MHC de clase I. Las células T CD8 ejemplares comprenden células T CD8 citotóxicas de memoria, células T CD8 reguladoras, células T CD8 citotóxicas efectoras y células adicionales identificables por un experto en la materia.

El término “progresor crónico” o “no controlador”, como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo que está infectado con VIH y que muestra un aumento en carga vírica con el tiempo, después de la infección inicial.

El término “se correlaciona” o “correlacionar” como se usa en el presente documento se refiere a una asociación estadística entre casos de dos hechos, donde los hechos pueden incluir números, conjuntos de datos y similares. Por ejemplo, cuando dos hechos implican números, una correlación positiva (también denominada en el presente documento “correlación directa”) significa que según aumenta uno, también aumenta el otro. Una correlación negativa (también denominada en el presente documento “correlación inversa”) significa que según aumenta uno, el otro disminuye.

El término “citocina” se refiere a proteínas solubles pequeñas secretadas por células que pueden alterar el comportamiento o propiedades de la célula secretora u otra célula. Las citocinas se unen a receptores de citocinas y desencadenan un comportamiento o propiedad en la célula, por ejemplo, proliferación, muerte o diferenciación celular. Las citocinas ejemplares incluyen, pero no están limitadas a interleuquinas (por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-1 α e IL-1 β), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), oncostatina M, eritropoyetina, factor inhibidor de leucemia (LIF), interferones, B7.1 (también conocido como CD80), B7.2 (también conocido como B70, CD86), miembros de la familia de TNF (TNF-alfa, TNF-beta, LT-beta, ligando de CD40, ligando de Fas, ligando de CD27, ligando de CD30, 4-1BBL, Trail), y MIF. Los niveles de citocinas se pueden determinar por varios métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISA, ELISPOT, inmunotransferencia y citometría de flujo. En una forma de realización preferida, la determinación de los niveles de citocinas para el método del primer aspecto se hace por citometría de flujo.

Como se usa en el presente documento, un paciente muy expuesto persistentemente seronegativo (HEPS) se refiere a un sujeto que, a pesar de tener evidencia de exposiciones múltiples y repetidas a VIH-1 a través de contactos sexuales sin protección, no posee IgG en suero reactiva a los antígenos víricos (véase, Beyrer C, *et al.*, J. Infect. Dis. 1999; vol. 79, págs. 59-68).

El término “variante”, como se usa en el presente documento se refiere a i) variantes del polipéptido en el que uno o más residuos de aminoácidos se sustituyen por un residuo de aminoácido conservado o no conservado, en donde tal residuo de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético, o ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más aminoácidos.

El término “VEB”, también llamado herpesvirus humano 4 (HHV-4), se usa a lo largo de la especificación para

describir un herpesvirus encontrado en cultivos celulares de linfoma de Burkitts. VEB es el agente causante en mononucleosis infecciosa, así como en un número de otras afecciones/estados de enfermedad relacionadas, incluyendo linfomas asociados a VEB.

5 El término “proteína de VIH Gag p24”, como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína de la cápside del VIH, que deriva de la poliproteína Gag procesada. En una forma de realización preferida, el péptido derivado de la proteína de VIH Gag p24 es un péptido con variaciones.

10 El término “proteína de VIH Gag p17”, como se usa en el presente documento, se refiere a la matriz que rodea la cápside asegurando la integridad de la partícula de virión de VIH. Deriva de la poliproteína Gag procesada. En una forma de realización preferida, el péptido derivado de la proteína de VIH Gag p17 es un péptido con variaciones.

15 El término “proteína Nef” se refiere a una proteína reguladora accesoria en VIH. En una forma de realización preferida, el péptido derivado de la proteína Nef es un péptido con variaciones.

20 El término individuo “muy expuesto persistentemente seronegativo” o “HEPS” o “HESN”, como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto expuesto al VIH y que no ha sido infectado con el virus. Se puede mostrar la presencia o ausencia de infección con VIH demostrando la presencia del anticuerpo contra VIH, antígeno de VIH o ácido nucleico de VIH en el sujeto humano demostrado mediante la detección de la presencia del virus usando pruebas de VIH que conocen los expertos en la materia (por ejemplo, EIA de VIH, inmunotransferencia, pruebas de PCR).

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

35 El término “exposición al VIH”, como se usa en el presente documento, se refiere al contacto de un sujeto sin una infección por VIH o SIDA y un sujeto que tiene una infección por VIH o SIDA, o el contacto con líquidos corporales de tal sujeto infectado por VIH, en el que tales líquidos del sujeto infectado se ponen en contacto con una membrana mucosa, un corte o excoriación en el tejido (por ejemplo, pinchazo de aguja, relaciones sexuales sin protección) u otras superficies del sujeto sin infectar de tal modo que el virus se pudiera transmitir del sujeto infectado o líquidos corporales del sujeto infectado al sujeto sin infectar.

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

45 El término “patógeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a un agente biológico que produce un estado de enfermedad (por ejemplo, infección, cáncer, etc.) en un huésped. Los “patógenos” incluyen, pero no están limitados a, virus, bacterias, arqueas, hongos, protozoos, micoplasmas, priones y organismos parasíticos.

50 El término “no progresores a largo plazo”, como se usa en el presente documento, se refiere a individuos que han estado infectado con el VIH durante aproximadamente 10 años o más, que se caracterizan por niveles normales y estables de células T CD4+, y que no han sido tratados con terapia antirretroviral. Estos individuos comprenden entre el 5 % y el 15 % de las personas infectadas por VIH crónicas. Un término más reciente referido a los no progresores a largo plazo es “controladores de VIH”, que define la no progresión basada en los niveles en plasma del ARN de VIH. Hay dos tipos de controladores “controladores de élite” que muestran ARN de VIH en plasma indetectable y “controladores vírémicos” con niveles detectables pero bajos de ARN de VIH en plasma. Véase, Deeks S, *et al.*, Immunity 2007; 27:406-416 y Ferre A, *et al.*, Blood 2009; 113(17):3978-3989.

55 El término “PBMC”, como se usa en el presente documento, se refiere a células mononucleares de sangre periférica, incluyendo, linfocitos, monocitos y macrófagos. Los métodos para aislar estas PBMC de una muestra de sangre se conocen bien en la técnica.

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

65 El término “inhibidores de la transcriptasa inversa”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que inhiba la actividad de la transcriptasa inversa de VIH-1, la enzima que cataliza la conversión del ARN

genómico vírico de VIH-1 en el ADN provírico de VIH-1.

El término “muestra que comprende células T”, como se usa en el presente documento, se refiere a tejidos o líquidos corporales separados de un mamífero, preferiblemente un ser humano, y que contienen células T.

En algunas formas de realización, las células T se aíslan de una muestra de mamífero antes de la exposición a las variantes del péptido. El término “aislado” con respecto a células T se refiere a una preparación de población celular en una forma que tiene al menos el 70, 80, 90, 95, 99 o 100 por cien de células T. En algunos aspectos, una población celular deseada se aísla de otros componentes celulares, en algunos casos para excluir específicamente otros tipos celulares que pueden “contaminar” o interferir con el estudio de las células en aislamiento. Sin embargo, se debe entender que tal población celular “aislada” puede incorporar tipos celulares adicionales que son necesarios para la supervivencia celular o para alcanzar los resultados deseados proporcionados por la divulgación. Por ejemplo, pueden estar presentes células presentadoras de antígeno, tales como monocitos (macrófagos) o células dendríticas en una población celular “aislada” de células T o añadirse a una población de células T aisladas para la generación de células T reguladoras. En algunos aspectos, estas células presentadoras de antígeno pueden ser monocitos o células dendríticas activadas. Las poblaciones celulares que comprenden células T para su uso en los métodos de la divulgación se pueden aislar de una muestra biológica tomada de un sujeto mamífero. La mezcla se puede originar de un número de fuentes incluyendo, pero no limitada a, sangre periférica, producto sanguíneo de leucaféresis, producto sanguíneo de aféresis, médula ósea, timo, biopsia tisular, tumor, tejido de ganglio linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a mucosa, hígado, sitios de lesiones inmunológicas (por ejemplo, líquido sinovial), páncreas y líquido cefalorraquídeo. El sujeto donante es preferiblemente humano, y puede ser fetal, neonatal, niño, adulto y puede ser normal, enfermo o susceptible a una enfermedad de interés.

En algunas formas de realización, la muestra de células T comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de una muestra de sangre. Mediante “células mononucleares de sangre periférica” o “PBMC” se quiere decir linfocitos (incluyendo células T, células B, células NK, etc.) y monocitos. En general, las PBMC se aíslan de un paciente usando técnicas estándar. En algunas formas de realización, solo se toman PBMC, bien dejando o devolviendo sustancialmente todos los glóbulos rojos y leucocitos polimorfonucleares al donante. Las PBMC se pueden aislar usando métodos conocidos en la técnica, tales como leucaféresis. En general, se realiza un paso de leucaféresis de 5 a 7 litros, que esencialmente retira las PBMC de un paciente, devolviendo los componentes sanguíneos restantes. La recogida de la muestra preferiblemente se realiza en presencia de un anticoagulante (por ejemplo, heparina).

La muestra que contiene células T que comprende las PBMC o células T aisladas se puede pretratar usando varios métodos antes de ponerla en contacto con la composición de variantes del péptido. En general, una vez recogidas, las células se pueden concentrar adicionalmente, si esto no se hizo simultáneamente con la recogida, o además purificar y/o concentrar las células. Por ejemplo, las PBMC se pueden purificar parcialmente por centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque). Las células aisladas de una muestra de donante normalmente se lavan para eliminar proteínas de suero y componentes sanguíneos solubles, tales como autoanticuerpos, inhibidores, etc., usando métodos bien conocidos en la técnica. En general, esto implica la adición de un medio o tampón fisiológico, seguido por centrifugación. Esto se puede repetir según sea necesario. Las células se pueden contar después, y en general, se recogen de 1×10^9 a 2×10^9 glóbulos blancos de una leucaféresis de 5-7 litros. Las células purificadas se pueden resuspender en un medio o tampón adecuado para mantener la viabilidad. Las soluciones adecuadas para la resuspensión en general serán una solución equilibrada de sales (por ejemplo, solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, etc.) opcionalmente suplementada con suero de ternera fetal, BSA, HSA, suero de cabra normal y/u otros factores naturales, junto con un tampón aceptable a una concentración baja, en general desde 5-50 mM. Los tampones convenientes incluyen, pero no están limitados a HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc.

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

El término “respuesta de tipo Th1”, como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta caracterizada por la producción de IFN- γ , que activa las actividades bactericidas de macrófagos e induce que las células B produzcan anticuerpos opsonizantes (de recubrimiento) y produce inmunidad celular. Esta respuesta también está caracterizada por la producción de TNF- α , MIP1- β e IL-2. Las respuestas Th1 son más eficaces contra patógenos intracelulares (virus y bacterias que están dentro de las células huéspedes).

El término “respuesta de tipo Th2”, como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta caracterizada por la liberación de IL-4, que produce la activación de células B para que produzcan anticuerpos neutralizantes (que aniquilan), lo que produce inmunidad humoral, e IL-10. Las respuestas Th2 son más eficaces contra bacterias, parásitos y toxinas extracelulares.

El término “respuesta de células T” significa una respuesta inmune en la que las células T median directa o indirectamente o contribuyen de otra manera a una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune mediada por células T se puede asociar con efectos mediados por células, efectos mediados por linfoquinas, etc., e incluso efectos asociados con células B si las células B son estimuladas, por ejemplo, por las linfoquinas secretadas por las células T. Para los LTC restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden ser lisis de células diana pulsadas con péptidos, pulsadas con precursores de péptidos o presentadoras de péptidos naturales, secreción de citocinas, preferiblemente interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptidos, secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido, o desgranulación. Para las células T cooperadoras restringidas a MHC de clase II, las funciones efectoras pueden ser secreción de citocinas inducida por péptidos, preferiblemente IFN-gamma o IFN- γ , TNF-alfa o TNF α , IL-4, IL-5, IL-10 o IL-12, o desgranulación inducida por péptido. Las posibles funciones efectoras para los LTC y células T auxiliares no están limitadas a esta lista.

El término “péptido con variaciones”, como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido con cobertura de la diversidad de secuencia de VIH significativamente aumentada que incluye aminoácidos alternativos en posiciones variables durante el paso de síntesis de péptidos. Véase, Frahm N, *et al.*, J. Immunol. 2007; 179: 6638-6650.

El término “serodiscordante” se refiere a cuando dos individuos en una pareja presentan una serología de VIH discordante, es decir, cuando un individuo en la pareja está infectado (tiene los anticuerpos en contra en su sangre) mientras que el otro no lo está.

El término “VEB” se refiere al virus de Epstein-Barr, que es el virus que causa la mononucleosis infecciosa.

El término “kit”, como se usa en el presente documento, se refiere a un producto que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención embalados de modo que permite su transporte y almacenamiento. Los materiales adecuados para embalar los componentes del kit incluyen cristal, plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno, policarbonato), botellas, viales, papel o sobres.

Los términos “determinación de una pluralidad de citocinas” o “detección de múltiples citocinas” se refieren a la detección de varias citocinas al mismo tiempo usando una única técnica, por ejemplo la técnica *Blow*.

Habiéndose descrito ahora la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

Procedimientos generales

1. Grupo de estudio

Se incorporaron pacientes seropositivos para VIH, incluyendo grupos de controladores y no controladores, y sujetos muy expuestos persistentemente seronegativos (HEPS) en un único centro (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, España). Los controladores de VIH se definieron como sujetos con cargas víricas por debajo de 2.000 copias/ml en ausencia de tratamiento antirretroviral y recuentos de CD4+ > 400 células/mm³ durante al menos los últimos 3 años. Los no controladores se definieron como individuos sin tratar con ARN en plasma > 50.000 copias de ARN de VIH/ml y recuentos de CD4+ < 300 células/mm³. Se realizó un análisis de inmunotransferencia completamente desarrollado para asegurar que el grupo no controlador incluía sujetos con una carga vírica alta identificados en una fase aguda de la infección por VIH.

2. Extracción de las PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron de la sangre completa reciente anticoagulada por centrifugación en gradiente de densidad (tubos Leucosep).

3. Cultivo celular y estimulación con péptidos

Se cultivaron las PBMC recién aisladas (500.000 células/pocillo) en una placa plana de 48 pocillos en un medio RPMI más suero bovino fetal (SBF) al 10 %, más antibióticos durante 6 horas para la tinción intracelular de citocinas o 5 días para la detección en el sobrenadante de citocinas. Las células se estimularon con péptidos con variaciones de p24 a una concentración final de 2 mg/ml de cada secuencia y se incubaron (37°C, CO₂ al 5 %). Se usaron bolas magnéticas anti-CD3 más anti-CD28 como control positivo, y RPMI como control negativo.

4. Citometría de flujo

Se estimularon PBMC recientes (500.000 células/pocillo) mediante péptidos con variaciones, bolas magnéticas anti-

CD3/CD28 o PBS 1x y se coestimularon usando anticuerpos contra CD49d y CD8 (Becton-Dickinson Labware Inc., Franklin Lakes, NJ, EE UU) durante 6 horas con GolgiStop (Becton-Dickinson Labware Inc., Franklin Lakes, NJ, EE UU). Además, se añadió anti-CD107a durante este periodo. Después de 6 horas de incubación los cultivos se mantuvieron durante la noche en el frigorífico hasta la tinción intracelular de citocinas. Para análisis de rutina, se evaluaron células fijadas permeabilizadas (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU) mediante citometría de flujo para la expresión de CD3, CD4, CD8 y citocinas Th1, Th2 y Th17. Se usaron los siguientes anticuerpos en varias combinaciones para evaluar múltiples funciones de células T estimuladas con péptidos: CD3-PE, CD4-APC, CD8-V500, CD14-V450, CD19-V450, LiveDead, CD107a-PeCy5, IFN- γ -FITC, IL-2-FITC, TNF α -FITC, MIP1b-FITC, IL4-PECy7, IL10-PECy7 e IL17-PECy7 (Becton-Dickinson Labware Inc., Franklin Lakes, NJ, EE UU). Las células se adquirieron en el citómetro de flujo LSR II (Becton-Dickinson Labware Inc., Franklin Lakes, NJ, EE UU) configurado para detectar 8 parámetros de color, y el análisis se realizó usando el software FACSDiva. Después de la selección de poblaciones, el ruido de fondo de las respuestas detectadas en los tubos de control negativo se restó de las detectadas en las muestras estimuladas para cada combinación funcional específica.

5. ELISpot de IFN- γ

Se realizaron ensayos ELISpot de IFN- γ como se ha descrito previamente. Véase, Harlow E, Lane D, "Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1988). Brevemente, se recubrieron placas de ELISpot (Millipore Corp., Bedford, MA, EE UU) con Acm anti-IFN- γ humano durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 100 μ l de PBS suplementado con SBF al 1 %. Se incubaron PBMC (100.000 células/100 μ l por pocillo) con estimulación de 0,2 mg/ml de SL9 y GL9 durante 16 horas. Se incluyó PHA (5 μ g/ml) como control positivo. Se detectó la captura de IFN- γ en los sitios de secreción mediante incubación con anti-IFN- γ humano conjugado con biotina a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de 6 lavados con PBS, se incubó estreptavidina conjugada con ALP a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después del lavado extenso con PBS, se añadió TRIS cloruro con NBT y sustrato. La reacción se paró con Tween 30 minutos después.

Se determinaron los umbrales para las respuestas positivas como superar 5 manchas (50 CFM/106) por pocillo y respuestas que superaban la "media de los pocillos negativos más 3 veces las desviaciones estándar" y "tres veces la media", cualquiera que fuera más alta.

6. Pacientes

Se incluyeron sujetos seropositivos para VIH (n=17), incluyendo controladores (n=10) y no controladores (7), sujetos muy expuesto persistentemente seronegativos (HESN) (MSM, hombres que tienen sexo con hombres, n=8; heterosexuales con pareja serodiscordante n=3) e individuos no expuestos al VIH (n=4) en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, y el centro social BCN Checkpoint, Barcelona, España. Los controladores de VIH se definieron como sujetos con cargas víricas por debajo de 2.000 copias/ml en ausencia de tratamiento antirretroviral y recuentos de CD4+ > 400 células/mm³ durante al menos los últimos 3 años. Los no controladores se definieron como individuos sin tratar con TARGA con ARN en plasma > 50.000 copias de ARN de VIH/ml y recuentos de CD4+ < 300 células/mm³ y con una inmunotransferencia completamente desarrollada para asegurar que no eran sujetos con alta carga vírica identificados en la fase aguda de infección por VIH (tabla I). Los HESN se identificaron de una cohorte de alto riesgo de hombres que tenían sexo con hombres (MSM) seguido en una base trimestral en Checkpoint, un centro social de MSM en Barcelona. El estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación local y todos los participantes proporcionaron consentimiento informado por escrito.

7. Cultivo celular

Para todos los ensayos, se usaron PBMC recién aisladas a las 4 horas de la venopunción. Para los estudios de citometría de flujo y FlowCytomix, se añadieron 500.000 células /pocillo a placas planas de 48 pocillos en un medio RPMI más SFT al 10 %, más antibióticos durante 6 horas para la tinción intracelular de citocinas (véase la sección de citometría de flujo aumentada) o 5 días para la detección de citocinas en el sobrenadante (véase la sección de FlowCytomix). Las células se estimularon con péptidos con variaciones de p24 individuales a una concentración final de 14 μ g/ml de cada secuencia y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5 % hasta que se usaron para el correspondiente ensayo. Se usaron bolas magnéticas de anti-CD3 más anti-CD28 (Invitrogene) o PMA (o 12-miristato 13 acetato de forbol) (10 ng/ml) más ionomicina (Io) como controles positivos. Como controles positivos adicionales para estimulación con péptido vírico, se usaron el conjunto de péptidos restringidos de MHC de clase I de VEB (conjunto 1 de VEB) y el conjunto de péptidos restringidos de MHC de clase II de VEB (conjunto 4 de VEB) para estimulaciones de células T CD8 y células T CD4, respectivamente, a una concentración final de 10 μ g/ml.

8. Análisis de FlowCytomix

En sobrenadantes de cultivos recogidos después de 5 días, se detectaron 13 citocinas usando un enfoque basado en flujo según la descripción del fabricante. El kit FlowCytomix 13-plex de Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 humanas (eBioscience) es un sistema de detección de analitos basado en bolas para la detección cuantitativa de IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-22 y TNF α por citometría de flujo. Brevemente, bolas

fluorescentes con diferentes tamaños y direcciones espectrales se recubren con anticuerpos que reaccionan específicamente contra las diferentes citocinas que se van a detectar. La mezcla de bolas recubiertas para cada citocina se incubó con las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añade un segundo anticuerpo conjugado con biotina y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir estreptavidina-ficoeritrina para detectar y cuantificar diferentes citocinas basado en el tamaño de las bolas y su espectro de emisión específico. Para respuestas específicas de antígeno, se aplicaron los niveles mediana (pg/ml) de los cultivos no estimulados para cada citocina a través de todos los pacientes como un umbral para respuestas positivas.

9. Citometría de flujo aumentada

El enfoque de citometría de flujo aumentada se basa en el protocolo de citocina intracelular previamente descrito para estudios de polifuncionalidad (Lamoreaux, L. 2006. Nat Protoc. 1:1507-1516), con unas pocas modificaciones. Brevemente, se estimularon PBMC recientes (500.000 células por pocillo) con péptidos con variaciones individuales y anticuerpos de CD49d y CD28 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) durante 6 horas en presencia de GolgiStop y un anticuerpo anti-CD107a (Becton Dickinson). Después de 6 horas de incubación los cultivos se mantuvieron durante la noche a 4°C hasta la tinción intracelular de citocinas. Después de lavar las células, el tinte reactivo para amina violeta (kit de tinción de células muertas fijable LIVE/DEAD®, Invitrogene) se añadió antes de que las células se tiñeran para marcadores de células T (CD3 PE, CD4, APC y CD8 V500 de Becton Dickinson) y para exclusión de linfocitos B y células mieloides usando CD19-V450 y CD14-V450 (Becton Dickinson), respectivamente. Para la tinción intracelular de citocinas, un paso de fijación y permeabilización (kit Fix y Perm de Invitrogen) fue seguido por tinción con anticuerpos contra citocinas Th1 conjugados con FITC (IFN- γ , IL-2, TNF α y MIP1 β) y con anticuerpos citocina Th2/17 conjugados con Pe-Cy7 (IL-4 (eBioscience), IL-10 e IL-17 (Biolegend)). Las células se recogieron en un instrumento LSR II (Becton Dickinson) configurado para detectar 8 parámetros de color, y se realizó el análisis usando software FACSDiva. Entre las células CD14- y CD19- vivas se seleccionaron células de los singletes, células T cooperadoras (CD3+CD4+) y LTC (CD3+CD8+) y se determinó el patrón de secreción de citocinas (de tipo Th1 y/o de tipo Th2/17) más la capacidad de desgranulación (CD107a+) (figura 5 suplementaria). Después de la selección, las respuestas de fondo detectadas en cultivos de control negativo se restaron de las detectadas en muestras estimuladas para cada combinación funcional específica. La inclusión de varias citocinas en el mismo canal aumenta la señal, pero también el fondo lo que implica la aplicación de valores de corte muy restrictivos. Como describen Roederer et al (Roederer, M. 2011. Cytometry A. doi: 10.1002/cyto.a.21015), las respuestas que se pudieron detectar después umbralizar los datos de la resta del fondo se consideraron señales positivas

10. ELISPOT de IFN γ (o IFN- γ)

Se añadieron PBMC recién aisladas (100.000 células PBMC/pocillo) en 140 μ l de R10 en placas de polivinilo de 96 pocillos (Millipore, Bedford, MA). Se usó el kit de IFN- γ Mabtech siguiendo las instrucciones del fabricante y como se ha descrito previamente (Frahm, N. 2007. Jour of Immunol). El umbral para las respuestas positivas se definió como al menos 5 manchas por pocillo y respuestas que superaban el “número medio de manchas en pocillos de control negativo más 3 desviaciones estándar de los pocillos de control negativo” y “tres veces la media de los pocillos de control negativo”, el que fuera más alto.

11. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando Prism Versión 4, GraphPad Prism. Después de la corrección de fondo de los ensayos de flujo aumentados, los datos se umbralizaron según los procedimientos de análisis previamente descritos (Roederer, M. 2011. Cytometry A. doi: 10.1002/cyto.a.21015). Se aplicó la prueba de χ^2 cuadrado para la detección de diferencias entre la calidad de respuestas positivas detectadas. Para comparaciones específicas, se aplicó la prueba de Mann-Whitney no paramétrica como se indica. En todos los análisis, se consideró el valor de $p < 0,05$ estadísticamente significativo. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney. Se aplicó la prueba χ^2 cuadrado. En todos los análisis se consideró el valor de $p < 0,05$ estadísticamente significativo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se analizaron pacientes seropositivos para VIH (n=18, controladores y no controladores) y sujetos muy expuestos persistentemente seronegativos (n=8) según los procedimientos generales anteriores.

El ensayo ELISpot de IFN- γ mostró respuestas mayores, en términos de magnitud y amplitud, en pacientes con VIH. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de controladores y no controladores de pacientes. Además, se detectaron menos respuestas en el grupo HEPS. Véase la figura 1.

La generación de respuestas adicionales generadas a péptidos con variaciones que abarcan p24, respuestas de tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α , MIP1- β , IL-2) o tipo Th2 (IL-4,-10) y Th17 (IL-17) en células T CD8+ y CD4+ se estudiaron mediante “Blow”. Brevemente, este ensayo se basa en la detección de citocinas aumentadas en el mismo canal de

fluorescencia por citometría de flujo. El análisis "Blow" de Th1 aumentada detectó significativamente más respuestas de tipo Th1 comparado con el ensayo ELISpot con mayor relevancia en la detección de respuestas positivas en la población HEPS. En general, el análisis "Blow" detectó significativamente más respuestas comparado con el ensayo Elispot de IFN- γ . Además de las respuestas de CD8 de IFN- γ medidas por Elispot de IFN- $\gamma\gamma$, los análisis "Blow" también distinguen respuestas de tipo "Th1" y "Th2/17" contra péptidos con variaciones en poblaciones de células T CD8 y CD4. El índice de detección aumentado era particularmente pronunciado en HEPS. Véase la figura 2.

Después de medir todas las respuestas CD4 y CD8 generadas, se pudo observar que mientras los pacientes infectados con VIH generaban principalmente respuestas CD8, la población HEPS produjo en su mayor parte una respuesta de células T CD4. Véase la figura 3A. Además, los perfiles de respuesta en controladores de VIH, no controladores y sujetos HEPS varió ampliamente en sus patrones de Th1 frente a Th2/IL-17 y sus capacidades de desgranulación, tanto para células T CD4 como CD8 (CD4Th1: $\chi^2=12,59$, $p=0,013$; CD4Th2: $\chi^2=11,04$, $p=0,026$; CD8Th1: $\chi^2=33,16$, $p=1,107e-06$; CD8Th2: $\chi^2=15,90$, $p=0,003$). Véase la figura 3B. Notablemente, las respuestas de células T CD8 en individuos HEPS fueron con frecuencia (el 52 % en Th1 y el 63 % en Th2/IL-17) productoras de citocinas pero no desgranularon (CD107-) en comparación con pacientes con VIH. Los perfiles de Th2 frecuentes observados en esta población podrían, sin embargo, estar sesgados por la inclusión de IL-17 en el mismo panel.

Como comparación, se evaluó la producción de citocinas individuales mediante FlowCytomix de 13 citocinas y ELISpot de IFN- γ . En efecto, la deconvolución posterior de *flow-cytomix* mostró un nivel elevado de citocinas (es decir, IL-17, IL-22, IL-9) en sujetos HEPS comparados con individuos VIH+. Véanse las figuras 4 A-D.

Ejemplo 2

Se ha repetido un experimento similar al mostrado en el ejemplo 1, pero usando PMA+I₀ o antígenos derivados de VEB como controles positivos (véase la figura 6 y 7), o un antígeno derivado de VIH diferente como p17. El uso del estímulo policlonal PMA+I₀ genera respuestas positivas mayores en HEPS que las estimulaciones específicas de péptido. Sin embargo, mediante el uso de conjuntos de péptidos de VEB, también se pueden detectar respuestas positivas. Además, usando el método de citometría de flujo aumentada, pudimos detectar respuestas a conjuntos de péptidos de VIH en individuos HESN (parejas serodiscordantes) similares a las respuestas detectadas después de la estimulación con conjuntos de péptidos de VEB. Por último, la presente invención permite la determinación de respuestas peptídicas específicas en CD4 (péptidos de MHC de clase II) así como en CD8 (péptidos de MHC de clase I) y respuestas de captura contra VIH en HESN no observadas hasta ahora.

REIVINDICACIONES

1. Método para ensayar la respuesta de células T específica contra un patógeno en un sujeto que comprende:
5 i) poner en contacto una muestra que comprende células T del sujeto con una composición que comprende un antígeno del patógeno y ii) determinar los niveles de una pluralidad de citocinas producidas por las células T en la muestra, en donde los niveles de la pluralidad de citocinas están determinados mediante
10 citometría de flujo aumentada, comprendiendo dicha citometría de flujo aumentada detectar, al mismo tiempo, varias citocinas en el mismo canal de fluorescencia, en donde la pluralidad de citocinas consiste en citocinas características de una respuesta Th1 y citocinas características de una respuesta Th2, en donde las citocinas características de una respuesta Th1 son IFN- γ , TNF- α , MIP1- β e IL-2 y en donde las citocinas características de la respuesta Th2 se seleccionan del grupo que consiste en IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13.
2. Método según la reivindicación 1 en donde la composición que comprende un antígeno es un antígeno o una biblioteca de antígenos.
15
3. Método según la reivindicación 2 en donde el antígeno o la biblioteca de antígenos del patógeno es una variante peptídica o una biblioteca de variantes peptídicas derivadas de un polipéptido del patógeno.
4. Método según la reivindicación 3 en donde la biblioteca de variantes peptídicas es un péptido con variaciones.
20
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el patógeno es VIH o VEB.
6. Método según la reivindicación 5 en donde el patógeno es VIH y en donde las variantes peptídicas derivan de la poliproteína Gag o Nef.
25
7. Método según la reivindicación 6 en donde las variantes peptídicas derivan de p24 o p17.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las citocinas características de una respuesta Th1 y las citocinas características de una respuesta Th2 se determinan en células CD4+ y/o en células CD8+.
30
9. Método según la reivindicación 8 que comprende además determinar los niveles de citocinas características de una respuesta Th9, Th17 o Th22.
35

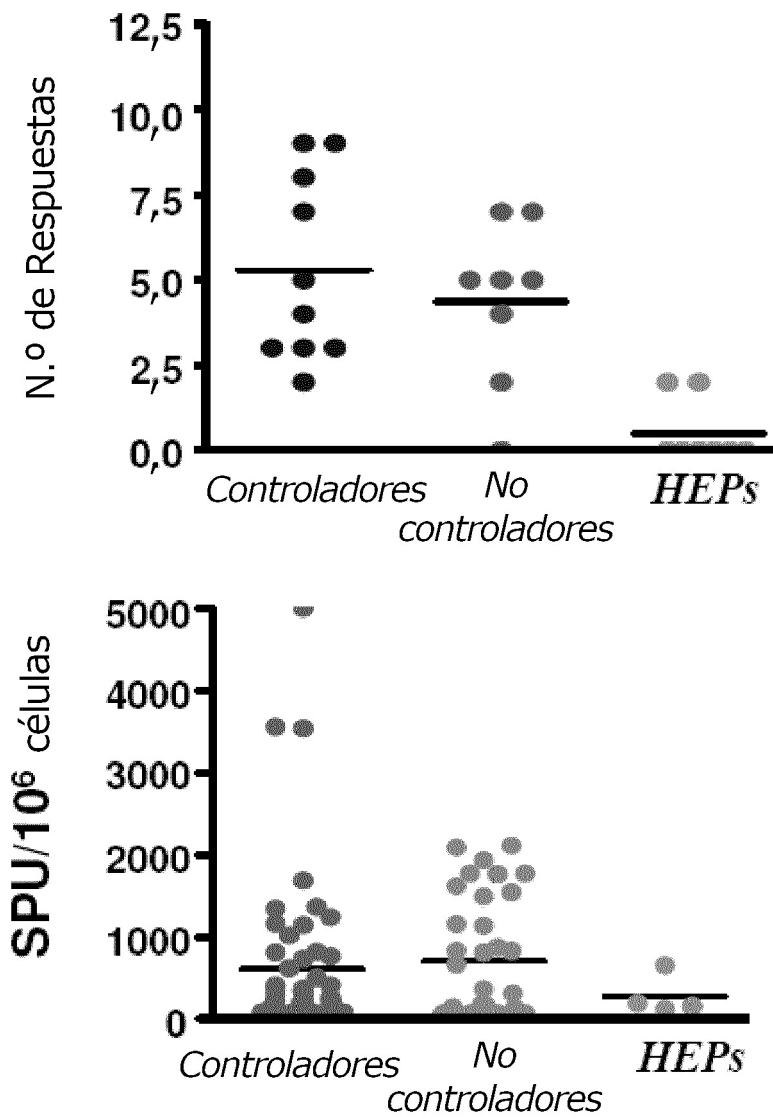


FIG. 1

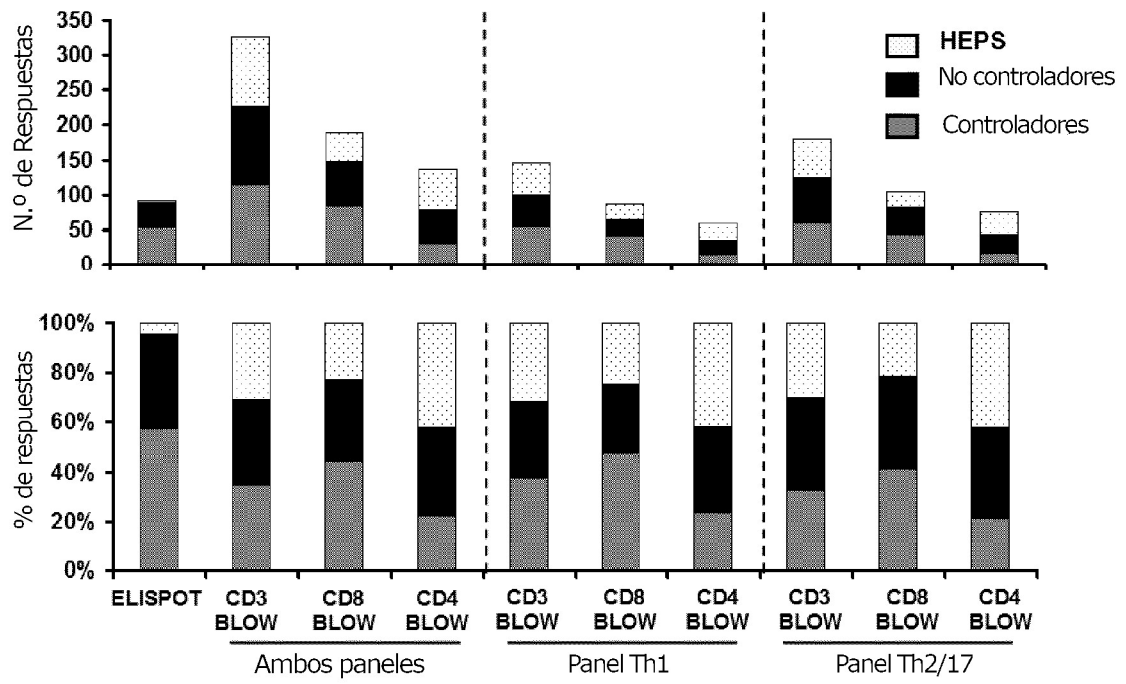


FIG. 2

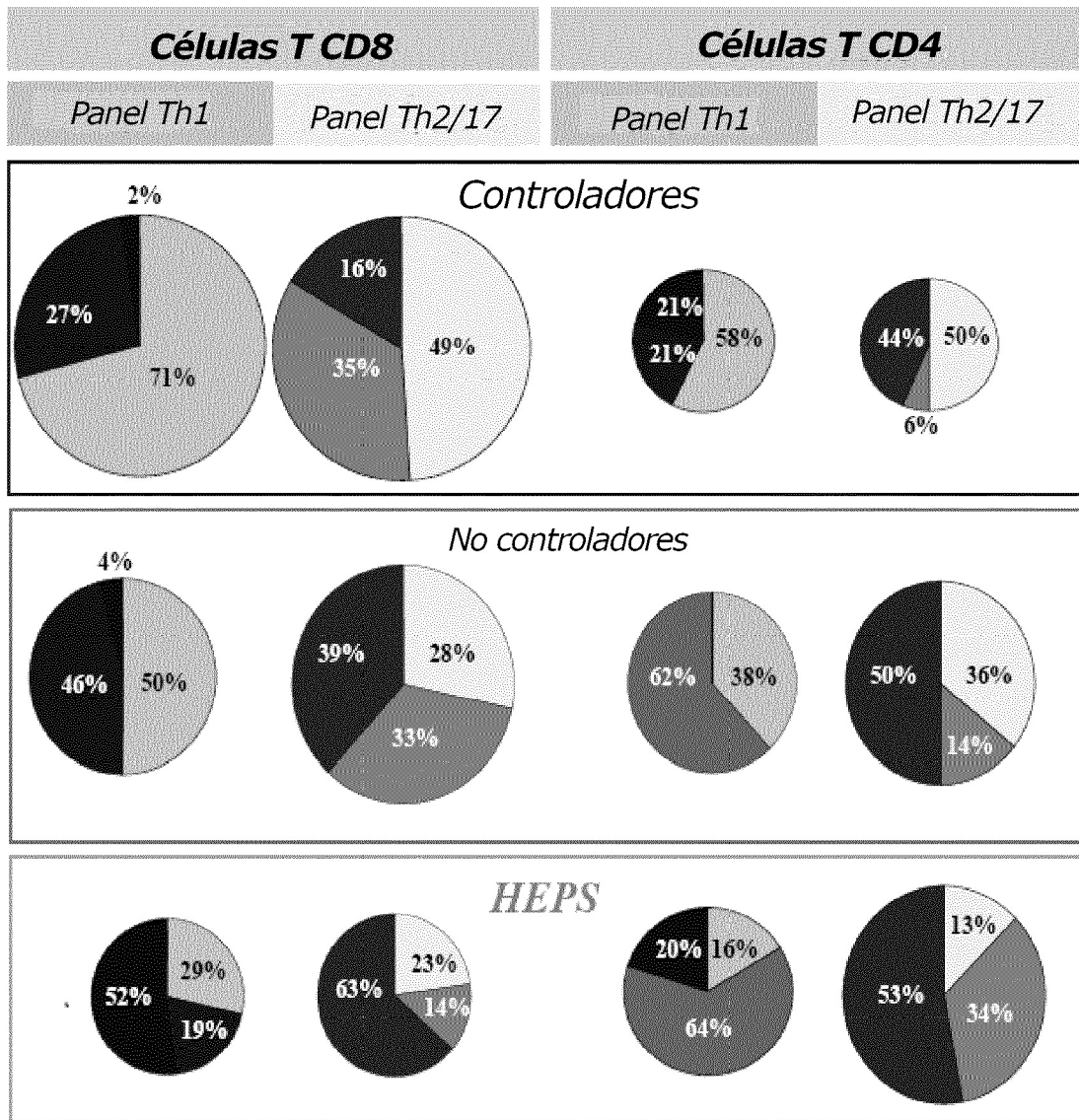


FIG. 3A

Número de respuestas en paneles de tinción Th1 o Th2/17	Células T CD8				Células T CD4			
	Controladores	No controladores	HEPS	valor p de prueba de χ^2	Controladores	No controladores	HEPS	valor p de prueba de χ^2
Respuestas de CD8 totales	84	63	43		30	49	57	
CD107+	29	12	6	$\chi^2=33,16$ $p<0,001$	8	8	4	$\chi^2=12,59$ $p=0,013$
CD107+Th1+	11	11	4		3	13	16	
Th1+	1	1	11		3	0	5	
Panel de tinción aumentada de Th1 total	41	24	21		14	21	25	
CD107+	21	11	5	$\chi^2=15,90$ $p=0,003$	8	10	4	$\chi^2=11,04$ $p=0,026$
CD107+Th2/17+	15	13	3		1	4	11	
Th2/17+	7	15	14		7	14	17	
Panel de tinción aumentada de Th2/17 total	43	39	22		16	28	32	

FIG. 3B

Figura 4A

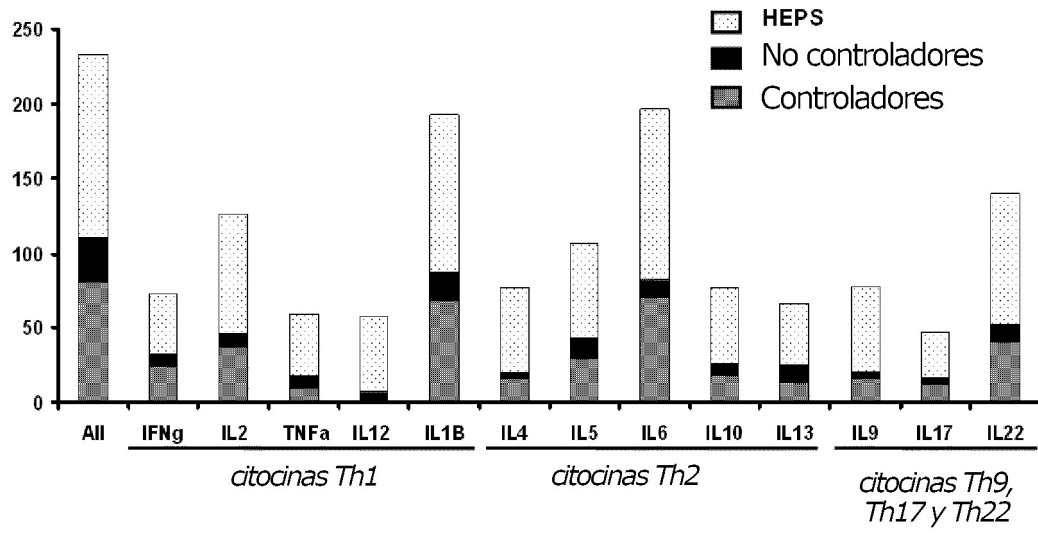


FIG. 4A

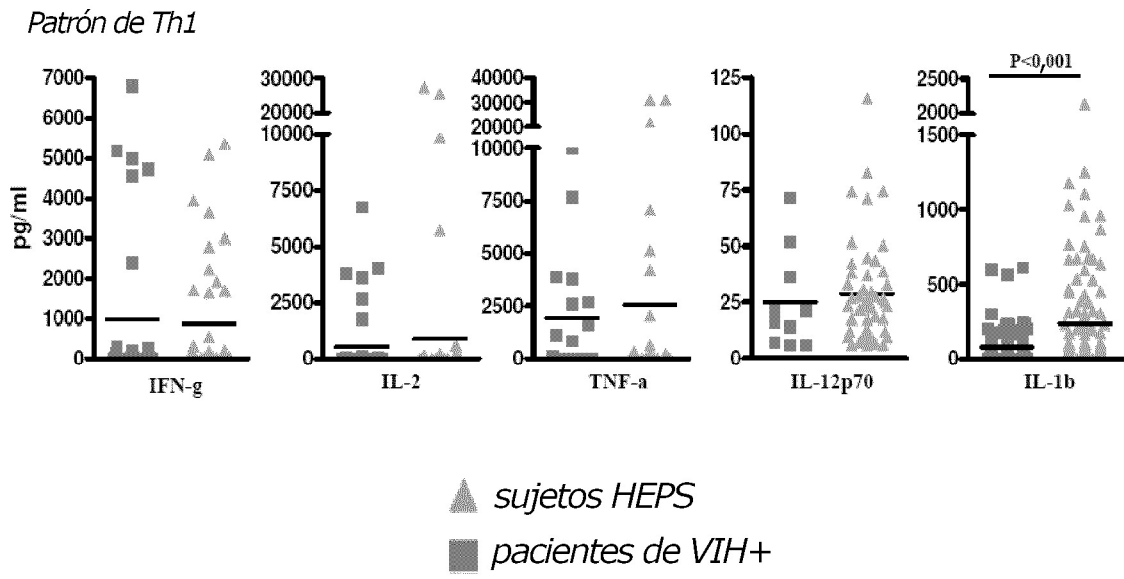


FIG. 4B

Patrón de Th2

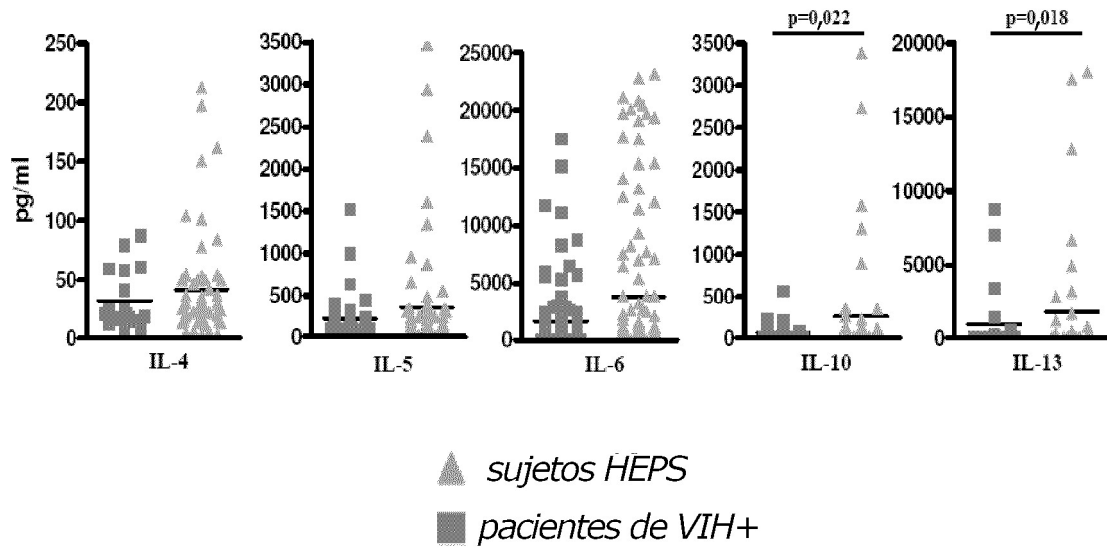


FIG. 4C

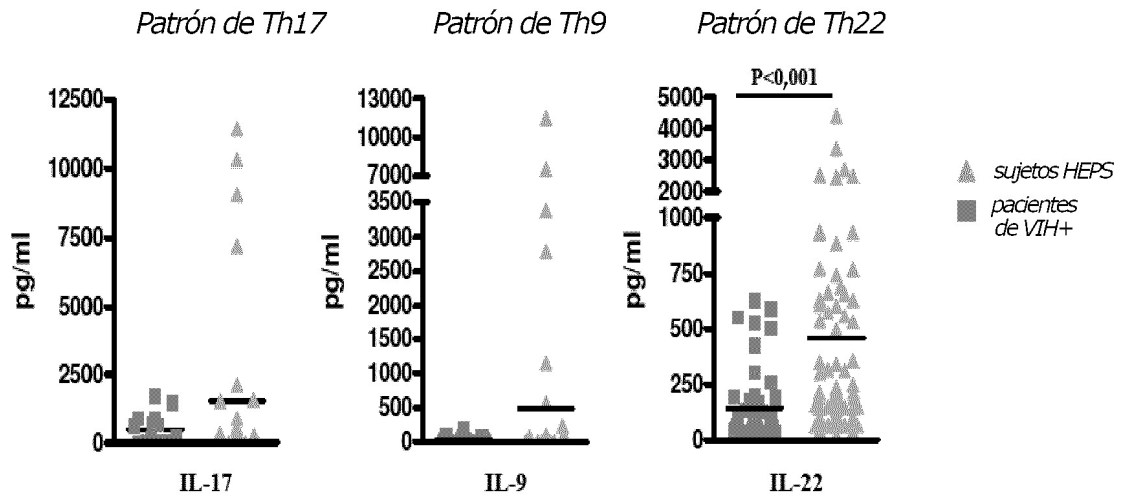


FIG. 4D

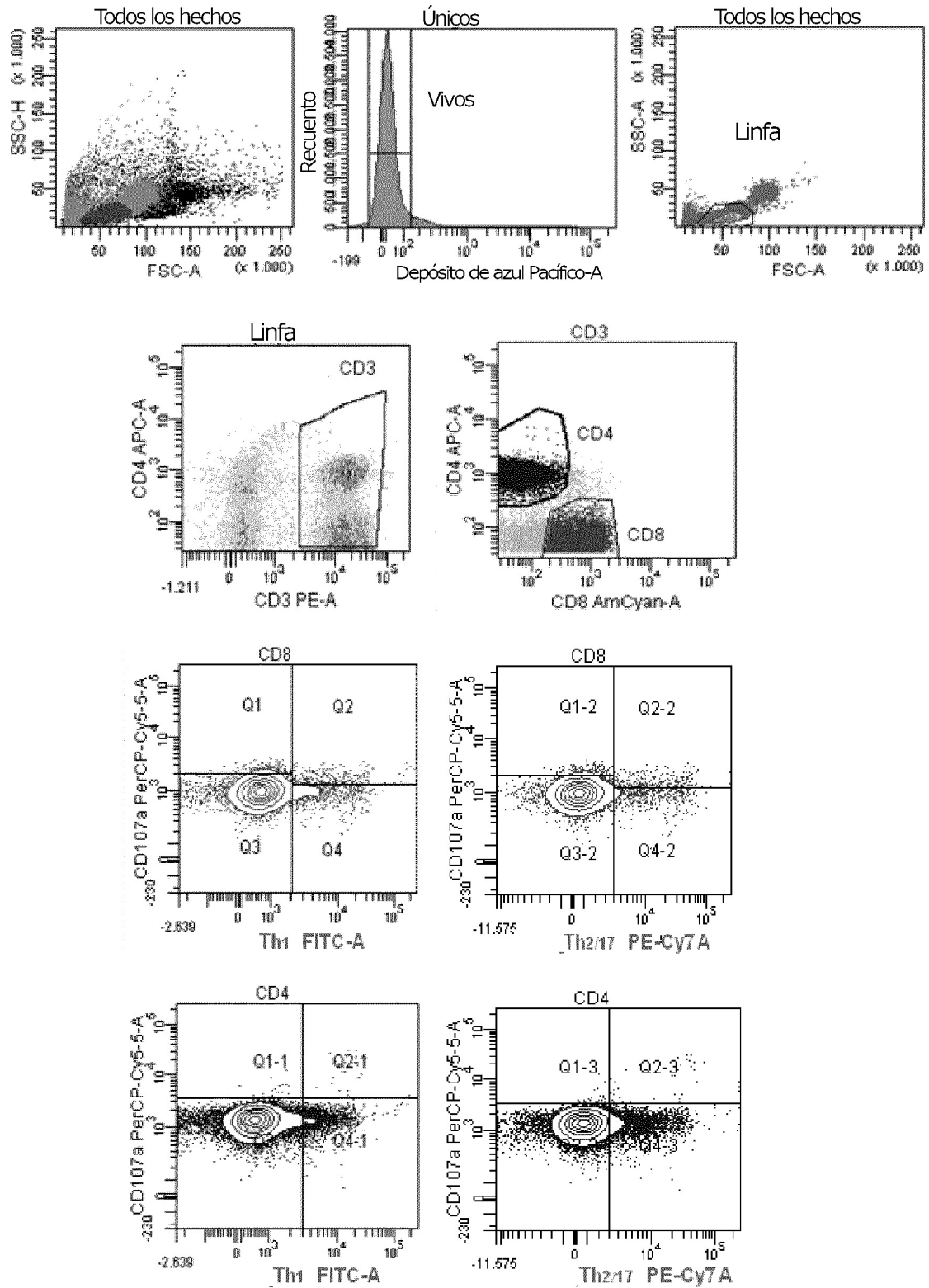


FIG. 5

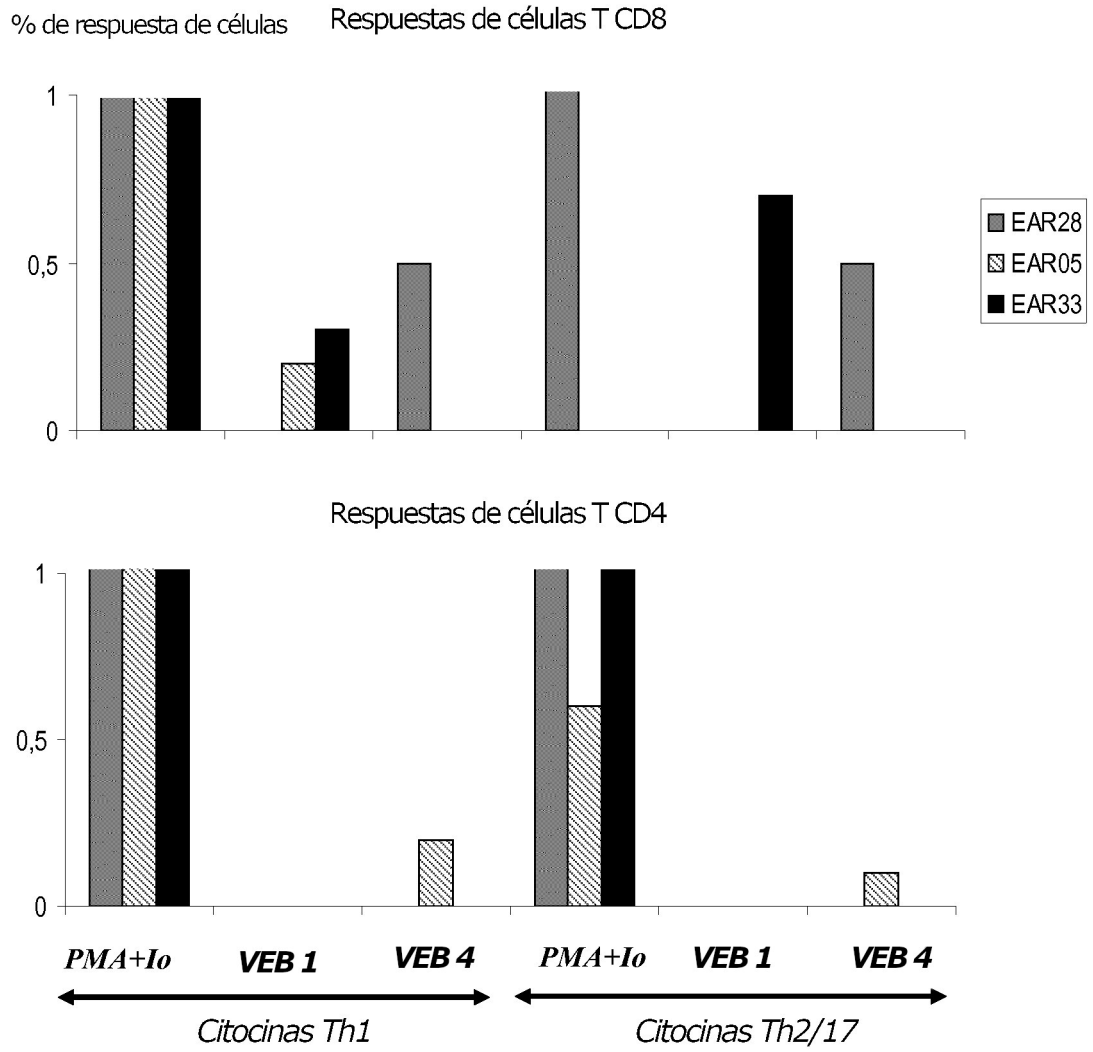


FIG. 6

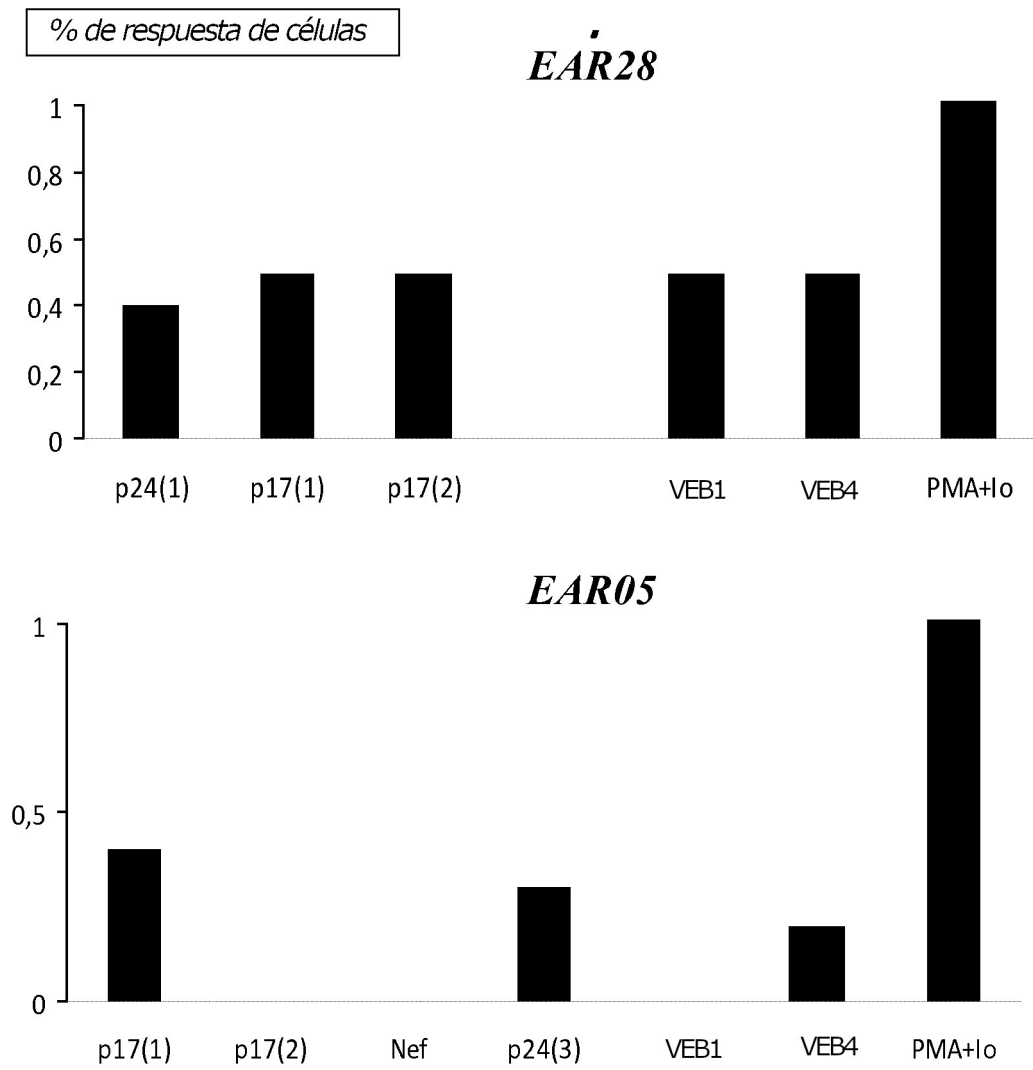


FIG. 7