

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR i

ANATOMIA PATOLÒGICA

***ESTUDI DE LA RESPOSTA IMMUNE EN
PACIENTS INFECTATS PEL VIH-1 SOTMESOS
A TERÀPIES IMMUNOMEDIADES***

Tesi Doctoral presentada per

Anna López Plana

Per optar al grau de

Doctora en Farmàcia per la Universitat de Barcelona

Directora de la tesi: Doctora Montserrat Plana Prades

Tutor: Doctor Carles Enrich Bastús

Barcelona, Novembre 2008

4. PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

4. PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

4.1 DISSENY DE L'ESTUDI I PACIENTS

4.1.1 Estudi de les interrupcions estructurades del tractament

Per dur a terme els objectius presentats es van incloure un total de 45 pacients reclutats en una única institució, l'Hospital Clínic de Barcelona. Els criteris d'inclusió d'aquests pacients van ser els següents: pacients adults amb infecció crònica pel VIH-1, amb un recompte de limfòcits T CD4+ basals $> 400/\text{mm}^3$ i una càrrega viral basal > 5.000 còpies/mL abans de rebre qualsevol tipus de tractament. Tots els pacients havien rebut tractament antiretroviral durant almenys un any i s'havien mantingut amb una càrrega viral inferior a les 20 còpies/ml durant com a mínim 32 setmanes abans de començar el calendari de STI. El calendari de les interrupcions estructurades del tractament va consistir en: 5 cicles de dues setmanes sense tractament seguides de 8 setmanes amb tractament antiretroviral; un cop finalitzat l'últim cicle, tots els pacients van ser seguits durant un mínim de 12 setmanes (període que anomenem Interrupció Definitiva del Tractament). D'aquests 45 pacients, 20 van ser reclutats d'un estudi pilot previ en el qual es comparaven les interrupcions estructurades del tractament en pacients als quals tan sols se'ls hi administrava TARGA, i pacients que prenen TARGA més hidroxiurea. Els resultats d'aquest estudi van suggerir que la hidroxiurea no afectava ni als anticossos VIH-1-específics ni a la resposta immune cel·lular.

En el moment de la inclusió, es va informar als pacients de la naturalesa de l'estudi i se'ls va oferir el consentiment informat per ser firmat. El seguiment i les extraccions es van dur a terme a les Consultes externes del Servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital Clínic de Barcelona.

4.1.2 Estudi de la vacuna terapèutica

Per realitzar aquest estudi es van incloure 18 pacients amb infecció crònica pel VIH-1 amb les següents característiques: amb un recompte basal i nadir de limfòcits T CD4+ superior a 500 cèl·lules/mL; una càrrega viral basal superior a 5000 còpies/mL abans de rebre qualsevol tractament antiretroviral i una càrrega viral plasmàtica < 20 còpies/mL durant com a mínim 104 setmanes mentre prenen el TARGA. Aquests pacients van ser randomitzats (2:1) per tal de ser immunitzats amb cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits pulsades *ex vivo* amb el virus autòleg del pacient inactivat per calor (n = 12) o bé per ser controls (n = 6), pacients que no rebrien la vacuna. Setanta-vuit setmanes abans de rebre la primera immunització, es va interrompre el TARGA (STOP1); en el moment en el qual la càrrega viral plasmàtica va pujar, es van fer 3 plasmafèresis per tal d'obtenir el virus autòleg amb el qual després es pulsarien les cèl·lules dendrítiques. Un cop obtingut el virus es va reiniciar el TARGA i aleshores la càrrega viral plasmàtica va tornar a disminuir fins a < 20 còpies/mL en tots els pacients. Després d'aquestes 78 setmanes, es van realitzar les 5 immunitzacions amb intervals de 6 setmanes. La primera immunització va ser un control negatiu, doncs les CD-DM no estaven pulsades amb el virus autòleg. Sis setmanes després de l'última immunització de la vacuna de cèl·lules dendrítiques, se'ls hi va interrompre el TARGA una altra vegada (STOP2), i els pacients es van seguir com a mínim durant 24 setmanes més.

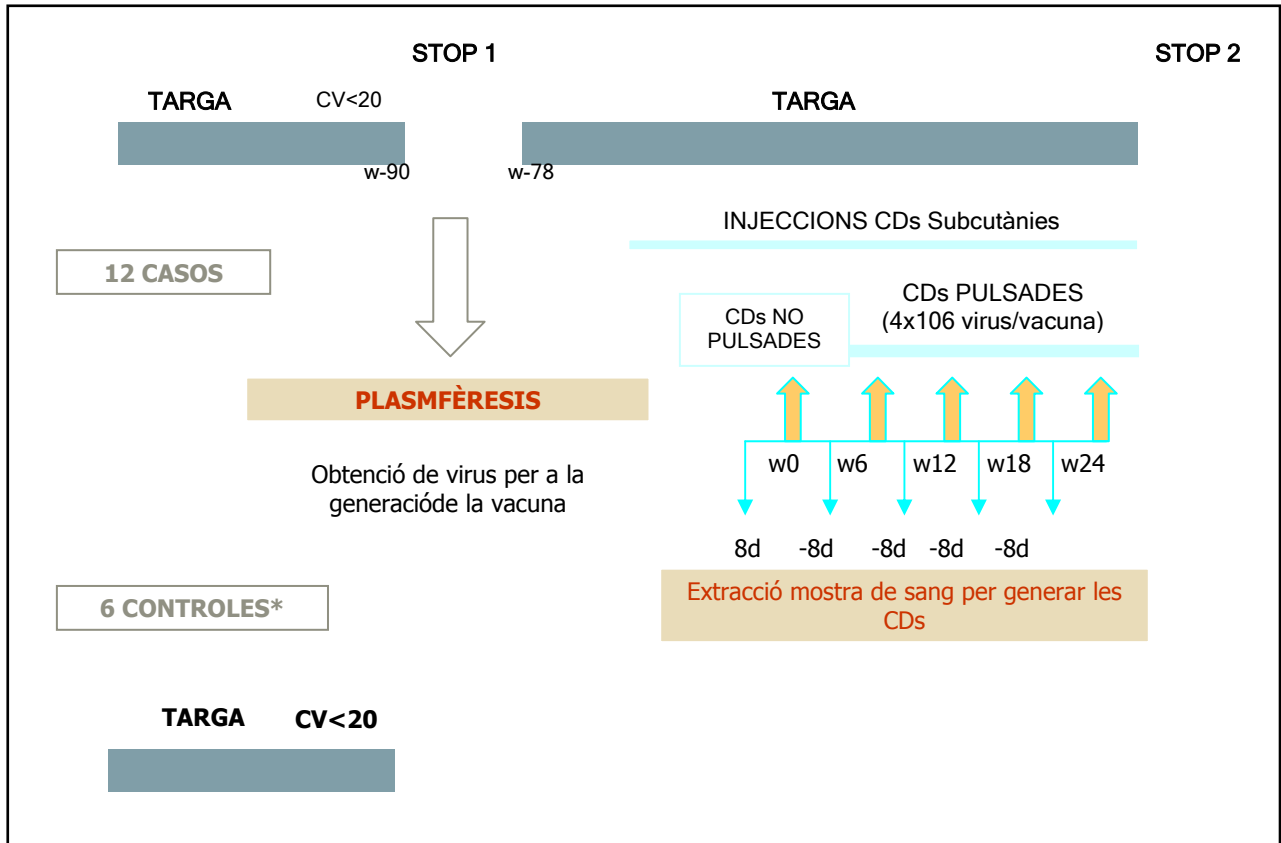


Figura 5. Esquema del disseny de l'estudi de la vacuna terapèutica amb cèl·lules dendrítiques.

4.2 OBTENCIÓ I PROCESSAMENT DE MOSTRES SANGUÍNIES

4.2.1 Obtenció de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

Es van obtenir a partir de sang anticoagulada amb EDTA amb un sistema de centrifugació per gradient de Ficoll-Hypaque seguint els següents passos:

- Centrifugar la sang a 2000 revolucions per minut (rpm) durant 10 minuts.
- Separar el plasma passant el sobrenadant a un tub cònic.
- Diluir la sang amb Dulbecco en una proporció 1:2. El Dulbecco és un tampó sense calci, magnesi ni bicarbonat, amb un pH 7,2 i que conté KCl (200 mg/L), KH₂PO₄ (200 mg/L), NaCl (8000 mg/L) i Na₂HPO₄ (1400 mg/L).

- Afegir lentament la sang diluïda a un altre tub cònic on prèviament s'hi havia afegit el Ficoll-Hypaque, de manera que la sang quedi sobre el Ficoll sense que es barregin, en una proporció 1:2 Ficoll/sang diluïda.
- Centrifugar a 2000 rpm 30 minuts. Durant la centrifugació els eritròcits i els granulòcits són agregats pel Ficoll i sedimenten ràpidament, mentre que els limfòcits i d'altres cèl·lules mononucleades queden a la interfase plasma-Ficoll. La gran majoria de les plaquetes s'eliminen durant les etapes de rentat. Després de centrifugar queden quatre fases separades : plasma, cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, Ficoll i hematíes.
- Recollir la fase de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica.
- Passar les cèl·lules a un tub net i afegir 50 mL de tampó Dulbecco.
- Centrifugar 10 minuts a 1500 rpm.
- Decantar el sobrenadant i resuspendre el *pellet* o botó cel·lular amb 50 mL de tampó Dulbecco.
- Repetir les dues operacions prèvies de centrifugació-decantació i resuspensió (rentat) dues vegades més.
- Després de la tercera centrifugació, decantar el sobrenadant i afegir 10 mL de medi RPMI-1640.
- Contar i ajustar a la concentració desitjada amb el medi de cultiu corresponent. En el nostre cas ho vam ajustar a 2×10^6 cèl·lules/mL en X-VIVO 10. El contacte cel·lular es va realitzar amb una càmera de plàstic d'un sol ús (HYCOR-Kova) amb 10 μ L de cèl·lules mononuclears, 10 μ L de sèrum fisiològic 0,9 i 10 μ L de Trypan Blue (dilució 1:3).

Aquestes cèl·lules obtingudes, en part es van utilitzar fresques el mateix dia de l'extracció, i en part van ser criopreservades en nitrògen líquid.

4.2.2 Obtenció del plasma

Es va obtenir a partir de la sang amb EDTA després de la primera centrifugació de 10 minuts a 2000 rpm. El sobrenadant és el plasma, que es va separar, es va aliquotar i es va guardar a -70°C per realitzar posteriorment les determinacions necessàries.

4.2.3 Obtenció del sèrum

Es va obtenir a partir de sang coagulada obtinguda en un tub sense anticoagulant. Aquesta sang es va centrifugar a 2000 rpm durant 10 minuts, separant el sobrenadant que és el sèrum, i es va aliquotar per guardar-lo posteriorment en un congelador a -80°C fins el moment de fer les determinacions necessàries.

4.2.4 Obtenció del pellet

Es va obtenir centrifugant 2×10^6 cèl·lules mononuclears de sang perifèrica en un tub Eppendorf a 15000 rpm durant 5 minuts. Es va descartar el sobrenadant i el pellet es va guardar en un congelador de -80°C.

4.2.5 Criopreservació de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

Les cèl·lules van ser criopreservades en 90% de FCS ("Fetal Calf Serum") més 10% de DMSO (Dimetilsulfòxid) i mantingudes, primer a -80°C i després en nitrògen líquid fins al seu processament.

4.2.6 Obtenció de les biopsies

De tots els individus amb amígdales accessibles es va biopsiar el teixit amigdalari i es van guardar en nitrogen líquid. Es va extreure biòpsia a la setmana 0 i a la setmana 30 (6 setmanes després de l'última dosi de vacuna de CD pulsades amb virus autòleg).

4.3 ESTUDI DE LA CÀRREGA VIRAL PLASMÀTICA

La concentració de l'ARN del VIH en plasma es va realitzar mitjançant la tècnica de RT-PCR (reacció en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa) quantitativa amb l'assaig comercial Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultra Sensitive Specimen Preparation Protocol Ultra Direct Assay (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ, USA) versió 1.5 seguint les instruccions del fabricant amb un límit de quantificació de 200 còpies/mL i 20 còpies/mL.

4.4 TIPATGE HLA

Es va realitzar el tipatge HLA de classe I de cada pacient seguint els protocols estàndar del laboratori d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Breument, es determina mitjançant PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotides, RELI Dynal, Madrid) l'ADN genòmic de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica i/o de cèl·lules B transformades pel virus d'Epstein-Barr, extret mitjançant el QIAmp Blood Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, EEUU). La definició dels al·lels dels gens de classe I es va realitzar automàticament mitjançant el software "RELI SSO Pattern Matching Software" i posteriorment supervisat manualment.

4.5 CITOMETRIA DE FLUX

4.5.1 Estudi de les subpoblacions limfocitàries T

L'estudi de les subpoblacions cel·lulars de limfòcits T CD4+ i CD8+ es va realitzar mitjançant immunofluorescència directa de triple marcatge amb anticossos monoclonals fluorocromats (PerCP, PE, FITC) i anàlisi per citofluorometria de flux (FACScalibur, Becton Dickinson) sobre PBMCs aïllades per centrifugació sobre gradient de Ficoll-Hypaque. Els passos que es van seguir van ser els següents :

- En tubs de polipropilè de 5 mL afegir 5 µL de cada un dels anticossos monoclonals comercials marcats amb els fluorocroms corresponents (PerCP, FITC i PE) (BD Biosciences.Pharmingen, San Diego, USA). En el subestudi de STI es van utilitzar els anticossos contra els següents CD (*Cluster of differentiation*) de superfície: CD3-PerCP, CD4-PerCP, CD8-PerCP, CD4-FITC, CD8-PE, CD28-PE, CD38-PE, CD45RO-PE, CD45RA-FITC, CXCR4-FITC i CCR5-PE a més a més dels controls isotípics negatius respectius (γ1-FITC, γ1-PE i γ1-PC). En el subestudi de la vacuna terapèutica els anticossos utilitzats van ser: CD3-PerCP, CD4-PerCP, CD8-PerCP, CD4-PE, CD56-PE, CD28-PE, CD38-PE, CD45RO-PE, CD8-FITC, CD57-FITC i CD45RA-FITC a més a més del control negatiu anteriorment esmentat.
- Posteriorment afegir a cada tub 50 µL de PBMCs resuspeses en medi RPMI 1640 (per tal de posar 10^5 cèl·lules per tub), agitar i incubar 30 min a 4°C.
- Afegir 2 mL de tampó de rentat. En el nostre cas el tampó estava preparat amb PBS dilució 1:1 (tampó fosfat salí), 0.5% de BSA (albúmina bovina) i 0.1% d'azida sòdica. Es centrifuga durant 5 min a 1500 rpm.
- Decantar el sobrenadant i afegir 200 µL de tampó de fixació (preparat amb PBS 1X i formol a l'1%).
- Guardar protegit de la llum fins al seu anàlisi en el citòmetre de flux.

Per l'anàlisi es van adquirir un mínim de 5000 cèl·lules en el citòmetre. Durant l'anàlisi i després de definir les cèl·lules mononuclears per forward (FSC) i side scatter

(SSC), es va definir una regió per FL3 on es van analitzar consecutivament FL1 i FL2 mitjançant l'ús del software CELLQuest® (Becton Dickinson).

4.5.2 Marcatge amb tetràmers

Per detectar i estudiar el fenotip de les cèl·lules T CD8+ tant CMV com VIH-1-específiques es van utilitzar tetràmers HLA classe I tals com: HLA-A*02-Gag (SLYNTVATL), HLA-A*02-Pol (ILKEPVHGV), HLA-A*03-Gag (KIRLRPGGKK), HLA-B*35-Pol (HPDIVIYQY) i HLA-A*02 CMV (NLVPMVATV) marcats amb el fluorocrom ficoeritrina (PE). Com a control negatiu es va utilitzar un tetràmer multi-al·lel negatiu (iTag™ Beckman Coulter Immunomics, Marseille, France). El nivell de cèl·lules tetràmer positives es va avaluar mitjançant citometria de flux utilitzant el FACSCalibur i marcatge amb 4 colors (FITC, PE, PerCP i APC). Les dades obtingudes es van analitzar amb el software CellQuest (Becton Dickinson, San Diego, CA). En combinació amb els tetràmers es van utilitzar una sèrie d'anticossos tals com anti-CD8-PerCP, anti-CD45RA-FITC i anti-CCR7 (purificat) més una Ig biotinitada i estreptavidina marcada amb APC. Per fer el marcatge es van utilitzar 1×10^6 cèl·lules/tub. Aquestes cèl·lules es van incubar amb 200 μ L de PBS durant 30 min a temperatura ambient i protegit de la llum amb el tetràmer i els anticossos corresponents. Les mostres es van rentar dues vegades amb 3 mL de PBS, es van centrifugar i tot seguit es van resuspendre amb 0.5 mL de PBS + 0.5% formol i es van guardar a 4°C fins a l'anàlisi en el FACS.

4.5.3 Marcatge intracel·lular de perforina

Per tal d'estudiar la proporció de cèl·lules tetramer+ que tenien la capacitat de produir perforina, es va realitzar un marcatge intracel·lular que consistia en posar 1×10^6 cèl·lules a incubar amb el complex tetramèric corresponent i amb els anticossos de superfície CD8-PerCP i CD28-APC (Becton Dickinson, San Diego, CA) a 4°C durant 30

min i protegit de la llum. Després de dos rentats amb PBS + 0.5% BSA + 0.1% azida sòdica, es va utilitzar un kit comercial Cytotfix/Cytoperm (Pharmingen, San Diego, CA) per tal de permeabilitzar les cèl·lules. Seguint el protocol recomenat pel fabricant, les cèl·lules van ser incubades amb la solució Cytotfix/Cytoperm durant 20 min a 4°C, rentades amb la solució Perm/Wash i tot seguit incubades amb anti-Perforina-FITC durant 30 min a 4°C. Després les cèl·lules van ser rentades i resuspeses amb 0.5 mL de PBS + 0.5% formol. Per tal de realitzar l'anàlisi es van adquirir un mínim de 20000 cèl·lules. El percentatge de cèl·lules tetràmer+ productores de perforina va ser avaluat tenint en compte el control negatiu establert.

4.6 ESTUDI DE LA RESPOSTA PROLIFERATIVA T (CD4+)

Es va realitzar l'anàlisi de la resposta proliferativa de les cèl·lules T en front a estímuls policlonals, antígens de record ubics i proteïnes del VIH-1. Es van seguir els següents passos:

- Les PBMCs es van resuspendre en medi lliure de proteïnes (X-VIVO 10, Biowhitacker, Maryland).
- Les cèl·lules es van cultivar per triplicat a 10^5 cèl·lules/pouet (en el cas dels cultius de 4 dies amb mitògens policlonals) o a 2×10^5 cèl·lules/pouet (en el cas de cultius de 7 dies amb antígens específics) en plaques de 96 pouets de fons en U en presència de medi de cultiu sol o medi de cultiu amb els diferents activadors.
- Els activadors utilitzats van ser de tres tipus:
 - o Estímuls mitogènics policlonals:
 - Fitohemaglutinina (PHA) 1% 90 μ g/mL (Murex, Biotech Ltd, England).
 - Anticòs anti-CD3 (OKT3) 10 ng/mL (Ortho Biotech Ltd, Raritan, NY).

- Anticòs anti-CD28 100 µg/mL, precipitat i purificat a partir de sobrenadant de cultiu de l'hibridoma 152-2E10, IgG1, produït pel Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.
- Antígens de record i ubics:
 - Toxoide Tetànic 2750U (Sanofi Pasteur).
 - Antigen del CMV 10 µg/mL (BioWhittaker).
- Proteïnes recombinants del VIH-1 produïdes en baculovirus (Protein Sciences, Meriden, CT) a una concentració de 5 µg/mL:
 - gp160
 - p24
- Els cultius cel·lulars amb l'activador es van incubar 4 o 7 dies en funció de l'activador (4 pels policlonals i 7 pels específics)
- Durant les últimes 18 hores de cultiu es va posar timidina tritiada a raó de 2 µCi/pouet diluïda en medi X-VIVO 10, i es va incubar a 37°C i 5% de CO₂ segons els procediments ja estandaritzats.
- La resposta limfoproliferativa es va avaluar mitjançant la recollida del cultiu i posterior lectura en un comptador de centelleig de radioactivitat beta (Betaplate LKB Wallac, Suècia), que va donar els resultats en comptes per minut (cpm).
- Les respostes proliferatives van ser considerades positives si eren superiors a 3000 cpm i si l'índex d'estimulació (SI) era superior a 3 per antígens específics o superior a 15 per estímuls policlonals. El SI es va obtenir del quocient cpm amb estímul/cpm sense estímul.

4.7 ESTUDI DE LES RESPOSTES CD8+ ESPECÍFIQUES ANTI-VIH-1

Per tal d'analitzar la resposta CD8+ específica contra un determinat antigen es quantifiquen aquelles cèl·lules que tenen la capacitat de produir determinades citocines en resposta a la presència d'aquest antigen. En aquest estudi es va realitzar mitjançant la detecció de producció d'IFN- γ per part de les cèl·lules CD8+ contra antígens o pèptids del VIH-1, i es va determinar mitjançant l'assaig d'ELISPOT (*enzyme-linked immuno spot assay*). Els passos a seguir van ser els següents:

- Es van utilitzar plaques PVDF de 96 pouets (Millipore, Bedford, MA) sensibilitzades amb 15 $\mu\text{g/mL}$ d'anticossos monoclonals anti-IFN- γ (Mabtech; Stockolm, Sweden) i bloquejades durant 3 hores amb RPMI 1640 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví.
- Les cèl·lules es van cultivar per duplicat durant 18 hores a 37°C, 5% CO₂ en presència d'un control negatiu, d'un control positiu amb PHA (1 $\mu\text{g/mL}$), dels diferents pèptids (4 $\mu\text{g/mL}$) del virus VIH-1 (gag, pol, env, nef) restringits pels diferents antígens del MHC de classe I atenent al genotip d'HLA del individu; també es van cultivar en presència de diferents pools de pèptids 15-mer de la proteïna Gag derivada de la seqüència de la soca HXB2. Les mostres analitzades van ser PBMCs, prèviament, criopreservades.
- Després de rentar la placa es va incubar durant 3 hores amb 1 $\mu\text{g/mL}$ d'anticòs monoclonal anti-IFN- γ biotinilat.
- Passades les 3 hores d'incubació amb l'anticòs de detecció, es va tornar a rentar la placa i s'hi va afegir el conjugat fosfatasa alcalina-estreptavidina (Mabtech) i ho vam deixar incubar 1 hora més.
- Després de rentar la placa s'hi van afegir 100 μL dels substrat cromogènic fosfatasa alcalina (Bio Rad Labs, Hercules, CA), i es va protegir de la llum.
- Uns 30 minuts més tard, aproximadament, la reacció colorimètrica es va parar mitjançant un rentat amb aigua corrent. Finalment la placa es va deixar secar fins a la lectura.

- Les cèl·lules formadores d'*spots* (*Spots forming cells* (SFC)) es van comptar amb l'ajuda del lector automatitzat AID ELISPOT reader (Autoimmun Diagnostica GmHb, Germany).
- El resultat del control negatiu (*background*) es va restar dels resultats obtinguts en presència del pèptid corresponent.
- La freqüència de les cèl·lules formadores d'*spots* es va expressar en SFC/10⁶ PBMCs.
- Es va considerar resposta positiva quan el resultat era superior a 40 SFC/10⁶ PBMCs.

<i>PEPTID</i>	<i>HLA</i>	<i>PROTEÏNA</i>	<i>SEQÜÈNCIA</i>	<i>NºRESIDU</i>
P0	A*01	NEF 111-119	WIYHTQGYF	9
P1	A*01	P17 71-79	GSEELRSLY	9
P2	A*01	RT 55-63	ISERILSTY	9
P3	A*11	P17 84-92	TLYCVHQRI	9
P4	A*11	P24 217-227	ACQGVGGPGHK	11
P5	A*11	RT 313-321	AIFQSSMTK	9
P6	A*11	RT 495-507	QIQEPPFKNLKTG	13
P7	A*11, A*03	NEF 71-80	QVPLRPMTYK	10
P8	A*11	NEF 82-90	AVDLSHFLK	9
P9	A*29	GP120 380-388	FNCGGEFFY	9
P10	B*35	P17 124-132	NSSKVSQNY	9
P11	B*35	P24 122-130	PPIPVGDIY	9
P12	B*35	RT 262-270	TVLDVGDAY	9
P13	B*35	RT 273-282	VPLDEDFRKY	10
P14	B*35	RT 311-319	SPAIFQSSM	9
P15	B*35	RT 330-338	HPDIVIQY	9
P16	B*35	GP120 41-50	VPVWKEATTTL	11
P17	B*35	GP4196-104	TAVPWNASW	9
P18	B*35	NEF 72-79	VPLRPMTY	8
P19	B*44	RT 358-367	EELRQHLLRW	10
P20	B*44	RT 552-561	TWETWWTEYW	10
P21	B*44	GP120 29-39	AAENLWTVYY	11
P22	B*08	P17 24-32	GGKKKYKLG	9
P23	B*08	P17 74-82	ELRSYNTV	9
P24	B*08	P24 127-135	GEIYKRWII	9
P25	B*08	P24 197-205	DCKTILKAL	9
P26	B*08	RT 173-181	GPKVKQWPL	9
P27	B*08	NEF 13-20	WPTVRERM	8
P28	B*08	NEF 90-97	FLKEKGGL	8
P29	A*02	P17 77-85	SLYNTVATL	9
P30	A*02	RT 334-342	VIYQYMDDL	9
P31	A*02	RT 464-472	ILKEPVHGV	9
P32	A*02	P24 61-70	GHQAAMQMLKE	11
P33	A*02	P24 87-101	HAGPIAPGQMREPRG	15
P34	A*02	P15 69-83	GNFLQSRPEPTAPPF	15
P35	A*02	P15 41-56	KEGHQMKDCTERQANF	16
P36	A*02	RT 263-273	VLDVGDAYFSV	11
P37	A*02	NEF 178-187	VLEWRFD SRL	10
P38	B*18	NEF 132-142	RYPLTFGW CYK	11
P39	B*51	P24 193-201	NANPDCKTI	9
P40	B*51	RT 283-290	TAFTIPSI	8
P41	B*51	GP41 47-55	RAIEAQQHL	9
P42	B*13	NEF 101-125	SQRRQDILDWYHTQGYFP DWQNY	25
P43	B*57	P24 15-23	ISPRTLNAW	9
P44	B*57	P24 30-40	KAFSPEVIPMF	11
P45	B*57, B*58	P24 108-117	TSTLQEQIGW	10
P46	B*57	P24 176-184	QASQEVKNW	9
P47	B*57	RT 398-407	PIVLPEKDSW	10
P48	B*57	RT 529-538	KITTESIVIW	10
P49	B*57	NEF 128-141	GPGVRYPLTFGW CY	14
P50	B*57	NEF114-123	HTQGYFPDWQ	10
P51	A*24	P17 28-36	KYKLGKHIW	9
P52	A*24	GP41 76-83	YLGKQQLL	8
P53	A*24	NEF 118-142	YFPDWQNYTPGPGIRYPLTF GW CY	25
P54	B*27	P24 131-139	KRWIILGLNK	10

P55	B*27	NEF 103-112	RRQDILDLWI	10
P56	B*27, A*03	P17 18-27	KIRLRPGGKK	10
P57	B*27	P24 131-140	RRWIQLGLQK	10
P58	B*27	GP41 276-284	GRRRGWEALK	10
P59	B*07	P24 16-24	SPRTLNAWV	9
P60	B*07	P24 48-55	TPQDLNTM	8
P61	B*07	P24 223-231	GPGHKARVL	9
P62	B*07	RT 311-319	SPAIFQSSMT	10
P63	B*07	RT 687-695	YLAWVPAHK	9
P64	B*07	GP120 302-311	RPNNNTRKSI	10
P65	B*07	GP41 333-341	IPRRIRQGL	9
P66	B*07	NEF 66-75	FPVTPQVPLR	10
P67	B*07	NEF 75-83	RPMTYKAAL	9
P68	B*07	NEF 100-113	HSQRRQDILDLWIY	14
P69	B*07	NEF 126-135	TPGPGVRYPL	10
P70	B*15	GP120 379-387	SFNCGGEFF	9
P71	A*03	RT 188-198	ALVICTEMEK	10
P72	A*03, A*33	RT 313-333	AIFQSSMTK	9
P73	A*03	GP41 786-778	RLRDLLIVTR	11
P74	A*03	NEF 190-198	AFHHVAREK	9
P75	A*32	GP41 701-720	VLSIVNRVRQGYSPLSFQTH	20
P76	A*33	P17 121-132	DTGHSNQVSQNY	12
P77	A*26	P24 A67-175	EVIPMFSAL	9
P78	A*26	RT 593-603	ETFYVDGAANR	11
P79	B*14	P24 183-191	DLNTMLNTV	9
P80	B*14	P24 298-306	DRFYKTLRA	9
P81	B*14	RT 648-672	ALQDSGLEVVTDTSQYALGI	19
P82	B*14	GP41 591-599	ERYLKDQQL	9

Taula 3. Pèptids restringits pel HLA de classe I.

GEN	PROTEINA	POOL		SEQÜÈNCIA
Gag1 -1	P17 -1		EP074001	MGA RAS VLS GGE LDR
Gag1 -2	P17 -2		EP074002	ASV LSG GEL DRW EKI
Gag1 -3	P17 -3		EP074003	SGG ELD RWE KIR LRP
Gag1 -4	P17 -4		EP074004	LDR WEK IRL RPG GKK
Gag1 -5	P17 -5		EP074005	EKI RLR PGG KKK YKL
Gag1 -6	P17 -6	P17-1	EP074006	LRP GGK KKY KLK HIV
Gag1 -7	P17 -7		EP074007	GKK KYK LKH IVW ASR
Gag1 -8	P17 -8		EP074008	YKL KHI VWA SRE LER
Gag1 -9	P17 -9		EP074009	HIV WAS REL ERF AVN
Gag1 -10	P17 -10		EP074010	ASR ELE RFA VNP GLL
Gag1 -11	P17 -11		EP074011	LER FAV NPG LLE TSE
Gag1 -12	P17 -12		EP074012	AVN PGL LET SEG CRQ
Gag1 -13	P17 -13		EP074013	GLL ETS EGC RQI LGQ
Gag1 -14	P17 -14		EP074014	TSE GCR QIL GQL QPS
Gag1 -15	P17 -15		EP074015	CRQ ILG QLQ PSL QTG
Gag1 -16	P17 -16		EP074016	LGQ LQP SLQ TGS EEL
Gag1 -17	P17 -17	P17-2	EP074017	QPS LQT GSE ELR SLY
Gag1 -18	P17 -18		EP074018	QTG SEE LRS LYN TVA
Gag1 -19	P17 -19		EP074019	EEL RSL YNT VAT LYC
Gag1 -20	P17 -20		EP074020	SLY NTV ATL YCV HQR
Gag1 -21	P17 -21		EP074021	TVA TLY CVH QRI EIK
Gag1 -22	P17 -22		EP074022	LYC VHQ RIE IKD TKE
Gag1 -23	P17 -23		EP074023	HQR IEI KDT KEA LDK
Gag1 -24	P17 -24		EP074024	EIK DTK EAL DK1 EEE
Gag1 -25	P17 -25		EP074025	TKE ALD KIE EEQ NKS
Gag1 -26	P17 -26		EP074026	LDK IEE EQN KSK KKA
Gag1 -27	P17 -27		EP074027	EEE QNK SKK KAA QAA
Gag1 -28	P17 -28	P17-3	EP074028	NKS KKK AQQ AAA DTG
Gag1 -29	P17 -29		EP074029	KKA QQA AAD TGH SNQ
Gag1 -30	P17 -30		EP074030	QAA ADT GHS NQV SQN
Gag1 -31	P17 -31		EP074031	DTG HSN QVS QNY PIV
Gag1 -32	P17 -32		EP074032	SNQ VSQ NYP IVQ NIQ
Gag1 -33	P17 -33		EP074033	SQN YPI VQN IQG QMV
Gag1 -34	P17 -34		EP074034	PIV QNI QGQ MVH QAI
Gag1 -35	P17 -35		EP074035	NIQ GQM VHQ AIS PRT
Gag1 -36			EP074036	QMV HQA ISP RTL NAW
Gag1 -37			EP074037	QAI SPR TLN AWV KVV
Gag1 -38			EP074038	PRT LNA WVK VVE EKA
Gag1 -39	P24 -39	P24-1	EP074039	NAW VKV VEE KAF SPE
Gag1 -40	P24 -40		EP074040	KVV EEK AFS PEV IPM
Gag1 -41	P24 -41		EP074041	EKA FSP EVI PMF SAL
Gag1 -42	P24 -42		EP074042	SPE VIP MFS ALS EGA
Gag1 -43	P24 -43		EP074043	IPM FSA LSE GAT PQD
Gag1 -44	P24 -44		EP074044	SAL SEG ATP QDL NTM
Gag1 -45	P24 -45	P24-2	EP074045	EGA TPQ DLN TML NTV
Gag1 -46	P24 -46		EP074046	PQD LNT MLN TVG GHQ
Gag1 -47	P24 -47		EP074047	NTM LNT VGG HQA AMQ
Gag1 -48	P24 -48		EP074048	NTV GGH QAA MQM LKE
Gag1 -49	P24 -49		EP074049	GHQ AAM QML KET INE
Gag1 -50	P24 -50		EP074050	AMQ MLK ETI NEE AAE
Gag1 -51	P24 -51		EP074051	LKE TIN EEA AEW DRV

Gag1 -52	P24 -52		EP074052	INE EAA EWD RVH PVH
Gag1 -53	P24 -53		EP074053	AAE WDR VHP VHA GPI
Gag1 -54	P24 -54		EP074054	DRV HPV HAG PIA PGQ
Gag1 -55	P24 -55		EP074055	PVH AGP IAP GQM REP
Gag1 -56	P24 -56		EP074056	GPI APG QMR EPR GSD
Gag1 -57	P24 -57		EP074057	PGQ MRE PRG SDI AGT
Gag1 -58	P24 -58		EP074058	REP RGS DIA GTT STL
Gag1 -59	P24 -59		EP074059	GSD IAG TTS TLQ EQI
Gag1 -60	P24 -60		EP074060	AGT TST LQE QIG WMT
Gag1 -61	P24 -61	P24-3	EP074061	STL QEQ IGW MTN NPP
Gag1 -62	P24 -62		EP074062	EQI GWM TNN PPI PVG
Gag1 -63	P24 -63		EP074063	WMT NNP PIP VGE IYK
Gag1 -64	P24 -64		EP074064	NPP IPV GEI YKR WII
Gag1 -65	P24 -65		EP074065	PVG EIY KRW IIL GLN
Gag1 -66	P24 -66		EP074066	IYK RWI ILG LNK IVR
Gag1 -67	P24 -67		EP074067	WII LGL NKI VRM YSP
Gag1 -68	P24 -68		EP074068	GLN KIV RMY SPT SIL
Gag1 -69	P24 -69		EP074069	IVR MYS PTS ILD IRQ
Gag1 -70	P24 -70		EP074070	YSP TSI LDI RQG PKE
Gag1 -71	P24 -71		EP074071	SIL DIR QGP KEP FRD
Gag1 -72	P24 -72	P24-4	EP074072	IRQ GPK EPF RDY VDR
Gag1 -73	P24 -73		EP074073	PKE PFR DYV DRF YKT
Gag1 -74	P24 -74		EP074074	FRD YVD RFY KTL RAE
Gag1 -75	P24 -75		EP074075	VDR FYK TLR AEQ ASQ
Gag1 -76	P24 -76		EP074076	YKT LRA EQA SQE VKN
Gag1 -77	P24 -77		EP074077	RAE QAS QEV KNW MTE
Gag1 -78	P24 -78		EP074078	ASQ EVK NWM TET LLV
Gag1 -79	P24 -79		EP074079	VKN WMT ETL LVQ NAN
Gag1 -80	P24 -80		EP074080	MTE TLL VQN ANP DCK
Gag1 -81	P24 -81		EP074081	LLV QNA NPD CKT ILK
Gag1 -82	P24 -82		EP074082	NAN PDC KTI LKA LGP
Gag1 -83	P24 -83	P24-5	EP074083	DCK TIL KAL GPA ATL
Gag1 -84	P24 -84		EP074084	ILK ALG PAA TLE EMM
Gag1 -85	P24 -85		EP074085	LGP AAT LEE MMT ACQ
Gag1 -86	P24 -86		EP074086	ATL EEM MTA CQG VGG
Gag1 -87	P24 -87		EP074087	EMM TAC QGV GGP GHK
Gag1 -88	P24 -88		EP074088	ACQ GVG GPG HKA RVL
Gag1 -89	P24 -89		EP074089	VGG PGH KAR VLA EAM
Gag1 -90	P24 -90		EP074090	GHK ARV LAE AMS QVT
Gag1 -91	P24 -91		EP074091	RVL AEA MSQ VTN SAT
Gag1 -92	P24 -92		EP074092	EAM SQV TNS ATI MMQ
Gag1 -93	P24 -93		EP074093	QVT NSA TIM MQR GNF
Gag1 -94	P24 -94	SP-1	EP074094	SAT IMM QRG NFR NQR
Gag1 -95	P24 -95		EP074095	MMQ RGN FRN QRK IVK
Gag1 -96	P24 -96		EP074096	GNF RNQ RKI VKC FNC
Gag1 -97	P24 -97		EP074097	NQR KIV KCF NCG KEG
Gag1 -98	P24 -98		EP074098	IVK CFN CGK EGH TAR
Gag1 -99	P24 -99		EP074099	FNC GKE GHT ARN CRA
Gag1 -100	P24 -100	SP-2	EP074100	KEG HTA RNC RAP RKK
Gag1 -101	P24 -101		EP074101	TAR NCR APR KKG CWK
Gag1 -102	P24 -102		EP074102	CRA PRK KGC WKC GKE
Gag1 -103	P24 -103		EP074103	RKK GCW KCG KEG HQM

Gag1 -104	SP -104		EP074104	CWK CGK EGH QMK DCT
Gag1 -105	SP -105		EP074105	GKE GHQ MKD CTE RQA
Gag1 -106	SP -106		EP074106	HQM KDC TER QAN FLG
Gag1 -107	SP -107		EP074107	DCT ERQ ANF LGK IWP
Gag1 -108	SP -108		EP074108	RQA NFL GKI WPS YKG
Gag1 -109	SP -109		EP074109	FLG KIW PSY KGR PGN
Gag1 -110	SP -110		EP074110	IWP SYK GRP GNF LQS
Gag1 -111	SP -111		EP074111	YKG RPG NFL QSR PEP
Gag1 -112	SP -112		EP074112	PGN FLQ SRP EPT APP
Gag1 -113	SP -113		EP074113	LQS RPE PTA PPE ESF
Gag1 -114	SP -114		EP074114	PEP TAP PEE SFR SGV
Gag1 -115	SP -115		EP074115	APP EES FRS GVE TTT
Gag1 -116	SP -116		EP074116	ESF RSG VET TTP PQK
Gag1 -117	SP -117	SP-3	EP074117	SGV ETT TPP QKQ EPI
Gag1 -118	SP -118		EP074118	TTT PPQ KQE PID KEL
Gag1 -119	SP -119		EP074119	PQK QEP IDK ELY PLT
Gag1 -120	SP -120		EP074120	EPI DKE LYP LTS LRS
Gag1 -121	SP -121		EP074121	KEL YPL TSL RSL FGN
Gag1 -122	SP -122		EP074122	PLT SLR SLF GND PSS
Gag1 -123	SP -123		EP074123	LRS LFG NDP SSQ

Taula 4. Pools de pèptids Gag VIH-1 (ORVACS).

4.8 SEQÜENCIACIÓ DEL VIRUS AUTÒLEG

4.8.1 Extracció de l'ADN proviral

Per l'obtenció de l'ADN proviral es va partir de *pellets* de PBMCs (2×10^6 cèl·lules) criopreservats. El protocol a seguir va ser el recomanat pel fabricant del kit comercial utilitzat QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

4.8.2 Amplificació dels fragments p17 i p24 del gen gag

L'amplificació dels fragments p17 i p24 del gen *gag* del VIH-1 es va realitzar mitjançant la combinació d'una primera PCR seguida d'una PCR interna o "nested".

- Primera PCR

La primera PCR es va realitzar a partir de 10 µL de l'ADN proviral. L'amplificació es va dur a terme amb 3.5 U/µL de l'ADN polimerasa d'alta fidelitat Expand High Fidelity Enzyme (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) i els primers específics C1 i C2 pel fragment p17 i, 5e i 3e pel p24 que es van utilitzar a una concentració final de 0.4 µM. El volum final de la reacció va ser de 50 µL amb una concentració de Mg²⁺ de 1.5 mM. Després de la fase de desnaturalització inicial a 94°C durant 3 min, es van realitzar 40 cicles d'amplificació segons el perfil següent: desnaturalització a 94°C 1 minut, hibridació dels primers específics a 47°C 1 minut i elongació de les cadenes a 72°C 1 minut. Finalment es va realitzar un únic cicle d'elongació a 72°C durant 5 min.

- Nested PCR

La Nested-PCR es va realitzar amb 5 µL del producte de la primera PCR. L'amplificació es va realitzar amb 3.5 U/µL de l'ADN polimerasa d'alta fidelitat Expand High Fidelity Enzyme i els primers específics p17.1 i p17.2 pel fragment p17 i, 5i i 3i pel p24 que es van utilitzar a una concentració final de 0.4 µM. El volum final de la reacció va ser també de 50 µL amb una concentració de Mg²⁺ de 1.5 mM. Les etapes d'aquesta PCR van ser els mateixos que els descrits per la primera PCR.

Els productes obtinguts de l'amplificació es van analitzar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa 1% en tampó Tris-borat EDTA (TBE) i van ser purificats abans de procedir a la clonació. Es va utilitzar el kit comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Invitrogen, Carlsbad, California).

PRIMER	SEQÜÈNCIA 5'-3'	POLARITAT
C1	GCG AGA GCG TCA GTA TTA AGC GG	+
C2	TCT GAT AAT GCT GAA AAC ATG GG	-
5e	CAG CAA TCA GGT CAG CCA AAA TTA C	+
3e	GTT ACT TGG CTC ATT GCT TCA GCC A	-
p17.1	TGG GAA AAA ATT CGG TTA AGG CC	+
p17.2	CTT CTA CTA CTT TTA CCC ATG C	-
5i	ATG GTA CAT CAG GCC ATA TCA CCT A	+
3i	CTA GTG TAG CCG CTG GTC CCA ATG C	-
M13 Fw	GTT TTC CCA GTC ACG AC	+
M13 Rv	CAG GAA ACA GCT ATG AC	-

Taula 5. Seqüències de primers. Primers usats per a l'amplificació i posterior seqüenciació de les regions p17 i 24 del gen gag del VIH-1

4.8.3 Clonació de les regions de les regions p17 i p24 del gen gag del VIH

- Lligació i transformació en bactèries competents

El clonatge dels productes de PCR purificats es va realitzar en el vector pGEM T-easy (Promega Corporation, Madison, WI, USA) mitjançant el sistema de lligació comercial DNA Rapid Ligation (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany). Per obtenir una lligació òptima es van emprar 50 ng del vector i 50 ng del producte de la PCR en un volum final de 20 µL. Per a la transformació es van utilitzar les bactèries competents d'alta eficàcia (E. coli DH5-α) en al·lquotes de 50 µL, a les quals se'ls hi afegia 5 µL de la lligació. Les bactèries es van incubar durant 30 min en gel i després d'un xoc tèrmic a 37°C de 20

segons se'ls hi va afegir 1 mL de medi LB sense ampil·lina i es va incubar 1 hora a 37°C amb agitació a 250 rpm. Tot seguit es va sembrar per extensió 20 µL i 200 µL del producte de la transformació en plaques de LB Agar amb ampil·lina a una concentració de 50 µg/mL (per a la selecció de les colònies recombinants resistents a aquest antibiòtic), IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) a una concentració de 0.2 mM i X-Gal (X-galactopyranoside) a una concentració final de 50 µg/mL (per a la selecció de bacteries recombinants per color). Les plaques es van incubar tota la nit a 37°C. Es van seleccionar les colònies pel seu color blanc.

- Obtenció de l'ADN plasmídic

Es van seleccionar unes 20 colònies blanques de cada mostra, cada una de les quals es va transferir a un tub amb 3 mL de LB líquid amb ampil·lina a 50 µg/mL i es va incubar durant tota la nit a 37°C amb agitació a 250 rpm. Després de centrifugar el cultiu de nit a 3000 rpm durant 30 min es va procedir a la purificació de l'ADN plasmídic des del *pellet* de cèl·lules amb el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Germany) seguint les instruccions del fabricant. Per tal de comprovar que l'ADN plasmídic contenia l'insert d'interès es va realitzar una PCR amb 2 µL d'ADN, primers específics del vector M13 Fw i M13 Rv a 0.2 µL i 12.5 µL de Go Taq Green Master Mix (Promega) en un volum final de 25 µL. Després d'un primer cicle de desnaturalització a 94°C i 5 min de durada es van realitzar 40 cicles d'amplificació segons el perfil següent: desnaturalització a 94°C 10 segons, hibridació dels primers específics a 50°C 10 segons i elongació de les cadenes a 68°C 2 minuts. Finalment, es va realitzar un únic cicle d'elongació a 68°C durant 10 minuts i es va comprovar la presència de l'insert en un gel d'agarosa 1% amb TBE.

4.8.4 Obtenció de la seqüència nucleotídica de les regions p17 i p24

Per obtenir, a partir de la miniprep de l'ADN recombinant, les seqüències de les diferents variants, es va emprar el mètode Dideoxy chain-termination (ABI PRISM Ready Reaction Amplitaq Fs, DyeDeoxy Terminators, Applied Biosystems). Les reaccions de seqüenciació es van realitzar a partir de 2 µL de la miniprep amb una concentració final de primer (M13Fw o M13Rv) de 0,5µM, 1 µL BigDyeTerminator v3.1 i 1,5 µL de tampó 5x (Applied Biosystems) en un volum final de 10 µL. Posteriorment a una desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C, es van realitzar 40 cicles d'amplificació segons el perfil següent: desnaturalització a 94°C 10 segons, hibridació dels primers específics a 50°C 10 segons i elongació de les cadenes a 60°C 2 minuts. Finalment, es va realitzar un únic cicle d'elongació a 72°C durant 10 minuts. Tot seguit es van purificar les reaccions de seqüenciació mitjançant el sistema comercial Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Millipore).

La seqüenciació la va realitzar la Unitat de Genòmica del Parc Científic de Barcelona, mitjançant electroforesi capil·lar en equips ABI Prism 3700 i ABI Prism 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Westerland, Germany).

4.8.5 Anàlisi de les seqüències

Els electroforogrames obtinguts van ser editats, compilats i traduïts amb el software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.1 (Isis Pharmaceutical Inc.) per obtenir la seqüència completa de cadascun dels clons moleculars.

Els alineaments múltiples de les seqüències nucleotídiques i d'aminoàcids es van realitzar mitjançant l'aplicació ClustalW implementada en el programa informàtic lliure MEGA3 (<http://www.megasoftware.net>). Posteriorment, els alineaments obtinguts es van editar i corregir manualment per assegurar que la lectura fos la correcta. Les seqüències de referència que es van utilitzar els diferents anàlisis van ser obtingudes a la base de dades de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>).

4.9 ANÀLISI ESTADÍSTIC

4.9.1 Estudi de les interrupcions estructurades del tractament

Sis dels pacients de la cohort estudiada es van excloure de l'anàlisi degut a la manca de dades. Per assolir l'objectiu de l'anàlisi, la CV es va considerar indetectable quan va ser equivalent a 20 còpies/mL. Abans de l'anàlisi els valors de les CV van experimentar una transformació logarítmica (\log_{10}). Per cada pacient els valors basals de CV plasmàtica i de CD4 abans de cap tractament antiretroviral van ser calculats com la mitjana de totes les mesures obtingudes en els últims dos anys abans de començar el tractament antiretroviral per primera vegada, tot exclouent la mesura de la infecció primària pel VIH-1. El *plateau* o *set point* de la CV es va definir com la mitja de totes les mesures de CV obtingudes des de la setmana 50 fins a la setmana 102 (mitjana de les mesures: 5 i el rang: 1-15).

Les correlacions obtingudes mitjançant el mètode de Spearman es van realitzar amb dades quantitatives. Les associacions independents entre les variables quantitatives van ser calculades per regressió múltiple. La mitjana de mesures per cada pacient va ser de 18 (rang: 7-30). Els canvis obtinguts de les dades quantitatives van ser analitzats mitjançant el test de Friedman. Els canvis i durabilitat de les variables quantitatives van ser analitzades mitjançant les mesures de l'àrea sota la corba (AUC) incorporant també el valor basal

4.9.2 Estudi de la vacuna terapèutica

Per assolir l'objectiu de l'anàlisi, la CV es va considerar indetectable quan va ser equivalent a 5 còpies/mL. Abans de l'anàlisi els valors de les CV van experimentar una transformació logarítmica (\log_{10}). El temps de duplicació de la CVP es va calcular mitjançant un mètode anteriorment descrit (Ho DD, Nature, 1995). El valor del set-point de la càrrega viral plasmàtica es va definir com el promig dels dos últims valors estables (amb una diferència de com a mínim $0,3 \log_{10}$), valors que s'havien de trobar separats, com a

mínim per un mes després de les 24 setmanes sense tractament. Les dades quantitatives de CVP, subtipus de limfòcits, resposta de les cèl·lules T CD8+, índex d'estimulació i l'activitat neutralitzant van ser comparats entre els dos grups mitjançant un test T-Student o bé mitjançant un test de Wilcoxon. Els canvis en la virèmia sobre un període de 12 setmanes després de la primera i la segona interrupció del TARGA es va analitzar mitjançant la mesura de l'àrea sota la corba, tenint en compte també el valor basal.