

**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

## **5. RESULTATS**



## **5. RESULTATS**

### **5.1 ESTUDI DE LES INTERRUPCIONS ESTRUCTURADES DEL TRACTAMENT**

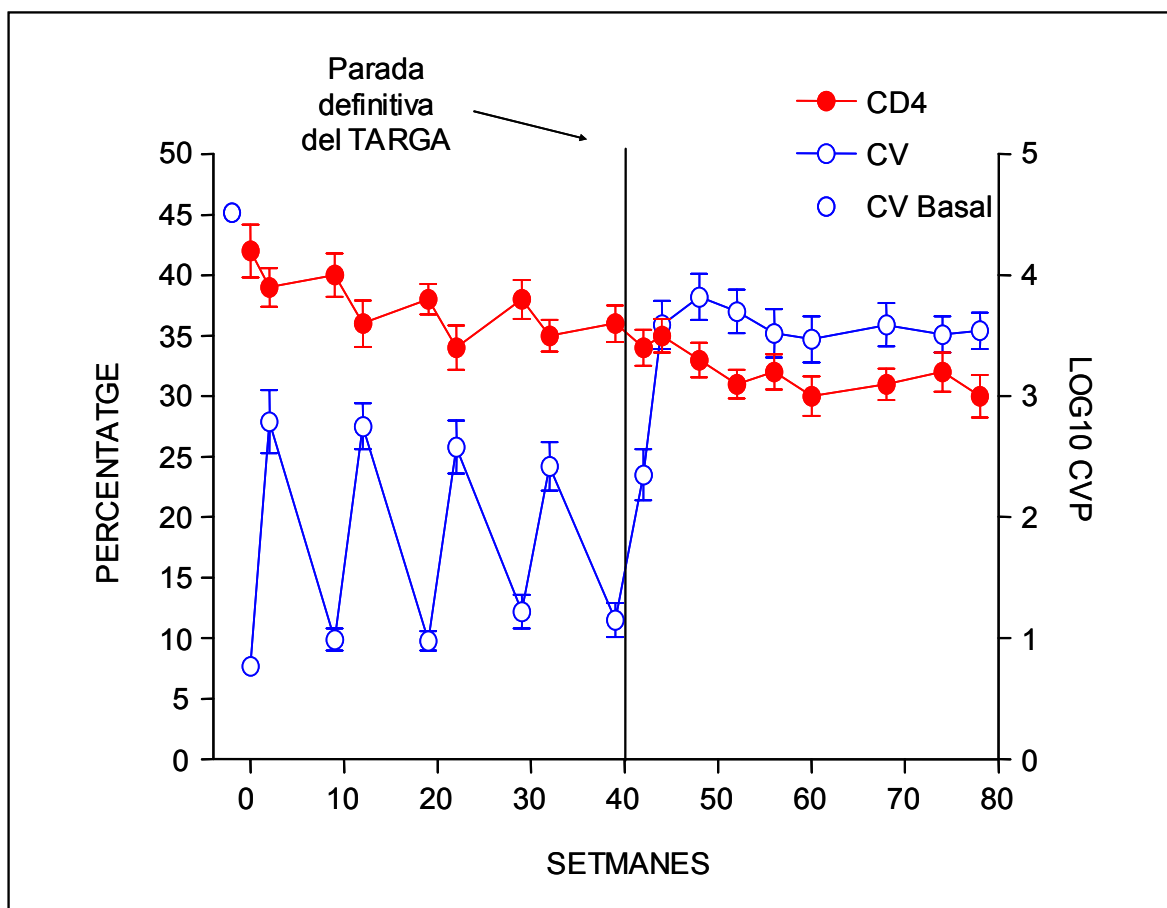
#### **5.1.1 Característiques dels pacients**

El 69% dels pacients inclosos en aquest estudi eren homes, i la mitja d'edat va ser de 36 anys (rang 32-40). Si parlem del factor de risc per a l'adquisició de la infecció pel VIH-1, va ser majoritàriament de transmissió sexual (en el 77% dels casos).

Tots els pacients estaven infectats pel VIH-1 i la mitja de la CV plasmàtica abans del TARGA va ser de 4.53 còpies/mL (rang 4.20-4.86 còpies/mL). La mitja de limfòcits T CD4+ abans del TARGA va ser de 569 cèl·lules/mm<sup>3</sup> (rang 416-721/mm<sup>3</sup>).

#### **5.1.2 Efectes de les interrupcions estructurades del tractament sobre la càrrega viral.**

Es va observar un rebrot de la càrrega viral plasmàtica durant els cicles de STI. El pic de CV assolit en el primer dels 5 cicles anava disminuint progressivament, però les disminucions observades entre els diferents cicles d'STI no van ser estadísticament significatives ( $p = 0.17$ ). Cal comentar que el *set point* de la CV assolit al final dels cicles de les interrupcions del tractament va ser significativament inferior a la CV basal abans de rebre TARGA ( $p < 0.0001$ ), i a més a més aquest set point viral es va poder correlacionar amb la CV basal abans del TARGA ( $r = 0.42$ ,  $p = 0.004$ ). Després de la interrupció definitiva del TARGA la CV va pujar significativament durant les primeres 4 setmanes, però després es va estabilitzar.



**Figura 6. Dinàmica de la CVP i el percentatge de limfòcits T durant el calendari d'interrupcions estructurades del tractament.** Dinàmica de la mitja  $\pm$  SE de la CVP durant els 4 cicles de STI i l'última interrupció de la teràpia antiretroviral. Canvis en la mitja  $\pm$  SE del percentatge de limfòcits T CD4+ durant l'estudi. La mitja de la CV basal està representada per un punt

### 5.1.3 Efectes de les interrupcions estructurades del tractament sobre el sistema immune.

#### 5.1.3.1 Subpoblacions limfocitàries

- Els resultats dels percentatges de limfòcits T CD4+ van mostrar una disminució significativa tant durant els cicles de STI (AUC  $10.8\% \pm 1.28$ ,  $p=0.008$ ) com durant el període d'interrupció definitiva del tractament ( $6.18\% \pm 0.61$ ,  $p=0.014$ ). Aquesta disminució es va observar principalment després de l'última interrupció del tractament. En general les cèl·lules T CD4+ van disminuir quan els pacients no estaven en tractament, mentre que es

va observar un lleuger augment d'aquestes cèl·lules quan els pacients es trobaven sota tractament antiretroviral. Cal comentar, però, que el percentatge de cèl·lules CD4+ es va establir quan es va assolir el set point viral 12 setmanes després de començar l'últim cicle d'STI i va ser estadísticament superior al percentatge de cèl·lules T CD4+ basal ( $30.80 \pm 1.06$  i  $27.36 \pm 1.16$  respectivament,  $p = 0.0033$ ). Es va observar una forta correlació entre els percentatges de cèl·lules T CD4+ detectades després d'assolir el set point viral i el percentatge de cèl·lules T CD4+ basal ( $r = 0.52$ ,  $P = 0.0006$ ).

- Pel que fa als resultats de les cèl·lules T CD8+ es va observar un increment ( $p < 0.0001$ ) del percentatge d'aquestes cèl·lules des del primer dia del primer cicle (dia 0) fins a la setmana 52 (12 setmanes després de l'última interrupció del TARGA). Aquest increment es va observar tant durant els cicles de STI com durant la interrupció definitiva del tractament. La mitja de l'AUC de l'increment del percentatge de les cèl·lules T CD8+ durant l'STI va ser  $9\% \pm 1.13$  ( $p < 0.0001$ ) i durant la interrupció estructurada del tractament  $4.65\% \pm 0.48$  ( $p = 0.02$ ). Tot i així cal comentar que el *plateau* assolit pel percentatge dels limfòcits T CD8+ va ser similar als valors basals.

- Es va observar un increment en el percentatge de cèl·lules T CD8+ CD28+ durant el període amb TARGA abans dels cicles de STI; aquest increment es va veure augmentat durant els cicles d'interrupcions estructurades del tractament. Tot i així el percentatge de cèl·lules T CD8+ CD28+ va disminuir significativament durant la interrupció definitiva del tractament i aquesta disminució no es va establir, tot i que es va mantenir significativament per sobre del nivell basal. El percentatge de cèl·lules T CD8+ CD28-CD57+ no va variar al llarg de l'estudi. Tampoc es van trobar canvis significatius en la població de cèl·lules T CD4+ CD28+.

- La població de cèl·lules T CD8+ CD38+ va augmentar de manera constant tant durant la interrupció definitiva del tractament com fins al final del seguiment de l'estudi. Tot i així, el *plateau* assolit per aquesta població es va mantenir significativament inferior al percentatge observat abans de qualsevol tractament. No es van observar canvis significatius en la població de cèl·lules T CD4+ CD38+.

Taula 6. Canvis en les subpoblacions de limfòcits T en funció del període de tractament.

	Setmana 0-Basal <sup>1</sup>	Cicles STI <sup>2</sup>	Setmanes 40-52 (IDT) <sup>3</sup>	Plateau/ basal <sup>4</sup>	Plateau/setmana 0 <sup>5</sup>	Plateau/setmana 40 <sup>6</sup>
<b>CD4+</b>	10.96 (6.8/15.1) <i>P</i> <0.0001	-10.8 ± 1.28 <i>P</i> =0.008	-6.18 ± 0.61 <i>P</i> =0.0138	-1.36 (-4.26/1.54) <i>P</i> =0.35	-10.23 (6.29/14.16) <i>P</i> <0.0001	-4.72 ( 2.42/7.02) <i>P</i> =0.0002
<b>CD8+</b>	-14.84 (9.78/19.9) <i>P</i> <0.0001	9 ± 1.13 <i>P</i> <0.0001	4.65 ± 0.48 <i>P</i> =0.0205	3.96 (-0.04/7.95) <i>P</i> =0.052	10.38 (6.71/15.05) <i>P</i> <0.0001	3.71(1.91/5.52) <i>P</i> =0.0002
<b>CD8+ 28+</b>	10.96 ( 4.82/17.10) <i>P</i> =0.0012	8.33±1.38 <i>P</i> <0.0001	-7.55±0.85 <i>P</i> =0.0072	6,69 (3.23/10.15) <i>P</i> =0.0005	- 3.68 (0.03/7.68) <i>P</i> =0.048	- 6.23 (3.18/9.27) <i>P</i> =0.0002
<b>CD8+ 38+</b>	-24.2 (19.14/29.25) <i>P</i> <0.0001	3.8 ± 0.63 <i>P</i> =0.42	10.38±1.05 <i>P</i> <0.0001	-11.84 (6.86/16.81) <i>P</i> <0.0001	10.8 (6.7/14.05) <i>P</i> <0.0001	10.22 (6.40/14.5) <i>P</i> <0.0001

<sup>1</sup>Canvis en els percentatges durant el període amb TARGA, comparant els valors de la setmana 0 abans de començar les interrupcions estructurades del tractament (STI) amb el valor basal abans de qualsevol tractament t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

<sup>2</sup> AUC: Area sota la corba, mitja ± SE canvis durant el període de STI; *P*: test de Friedman

<sup>3</sup> AUC: mitja ± SE, canvis durant les 12 setmanes després de l'última interrupció del TARGA; *P*: test de Friedman.

<sup>4</sup> Canvis en els percentatges comparant els valors en el plateau (mitjana de totes les mesures disponibles des de la setmana 50 fins a la setmana 102) amb els valors basals; t-test: mitja de la diferència (CI 95%).

<sup>5</sup> Canvis en els percentatges comparant els valors en el plateau amb els valors a la setmana 0; t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

<sup>6</sup> Canvis en els percentatges comparant els valors en el plateau amb els valors a la setmana 40, el dia de l'última interrupció del TARGA; t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

NP: Not performed at baseline

- El comportament de la població de cèl·lules T naïve CD4+ CD45RA+ CD45RO- durant el període amb TARGA abans del cicle d'interrupcions va diferir de l'observat durant les interrupcions, doncs durant aquest últim període es va observar un augment important d'aquesta població. El percentatge de cèl·lules T CD4+ naïve es va estabilitzar durant la interrupció definitiva del tractament, però va anar disminuint fins al final de l'estudi. El percentatge de cèl·lules memòria T CD4+ CD45RA- CD45RO+ va disminuir significativament tant durant els cicles de STI com durant la interrupció definitiva del tractament i després la tendència va ser a disminuir.
- Durant els cicles d'interrupcions estructurades del tractament i la interrupció definitiva del tractament es va observar una disminució en el percentatge de cèl·lules T CD8+ CD45RA+ CD45RO- (naïve), mentre que el percentatge de les cèl·lules T CD8+ CD45RA- CD45RO+ (memòria), durant els mateixos períodes, va augmentar significativament ( $7.87 \pm 1.25$  p < 0.0001). Aquests canvis es van mantenir fins al final de l'estudi.



Table 7: Canvis en les subpoblacions de cèl·lules T naive i memòria en funció del període de tractament.

	Setmana 0-Basal <sup>1</sup>	Cicles STI <sup>2</sup>	Setmanes 40-52 (DTI) <sup>3</sup>	Plateau/ basal <sup>4</sup>	Plateau/Setmana 0 <sup>5</sup>	Plateau/Setmana 40 <sup>6</sup>
<b>CD4+ RA+ RO-</b>	-1.06 (-11,78/9.65) P=0.84	7.17±0.7 P<0.0001	1.25 ± 0.3 P=0.76	1.72 (-5.10/8.54) P=0.62	2.85 (-0.14/5.84) P=0.06	-1.22 (-3.9/1.45) P=0.36
<b>CD4+RA+62L+</b>	NP	11.94±1.88 P<0.0001	7.12 ± 0.97 P= 0.34	NP	9.38 (4.3/14.45) P=0.0006	-0.47 (-2.67/1.72) P=0.66
<b>CD4+ RA- RO+</b>	6.81 (1.44/12.19) P=0.0153	-8.71±1.86 P=0.0028	-5.00 ± 0.57 P= 0.028	5.38 (1.41/9.35) P=0.0098	-0.78 (-3.18/2.24) P= 0.60	0.28 (-2.25/2.82) P= 0.82
<b>CD8+ RA+ RO-</b>	9.62 (1.69/17.55) P=0.0197	-6.04±0.57 P=0.0039	-8.4±0.8 P=0.0009	-1.88 (-6.6/2.84) P= 0.42	- 9.26 (6.82/11.7) P<0.0001	-6.74 (3.37/10.11) P=0.0002
<b>CD8+ RA- RO+</b>	2.58 (-1.89/7.05) P=0.24	7.58±1.35 P<0.0001	6.86±0.67 P<0.0001	3.73 (0.002/7.43) P=0.0487	9.42 (6.15/12.69) P<0.0001	6.63 (4.17/9.1) P<0.0001

<sup>1</sup>Canvis en els percentatges durant el període amb TARGA, comparant els valors de la setmana 0 abans de començar les interrupcions estructurades del tractament (STI) amb el valor basal abans de qualsevol tractament t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

<sup>2</sup>AUC: Area sota la corba, mitja ± SE canvis durant el període de STI; P: test de Friedman

<sup>3</sup>AUC: mitja ± SE, canvis durant les 12 setmanes després de l'última interrupció del TARGA; P: test de Friedman.

<sup>4</sup>Canvis en els percentatges comparant els valors en el plateau (mitjana de totes les mesures disponibles des de la setmana 50 fins a la setmana 102) amb els valors basals; t-test: mitja de la diferència (CI 95%).

<sup>5</sup>Canvis en les percentatges comparant els valors en el plateau amb els valors a la setmana 0; t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

<sup>6</sup>Canvis en els percentatges comparant els valors en el plateau amb els valors a la setmana 40, el dia de l'última interrupció del TARGA; t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

NP: Not performed at baseline

- L'expressió dels principals coreceptors del VIH-1 es va comportar de la següent manera: l'expressió de CCR5 tant en les cèl·lules CD4+ com en les CD8+ va augmentar significativament entre la setmana 0 i la 52 del present estudi; tot i així la tendència a partir de la setmana 64 (24 setmanes després de la interrupció definitiva del tractament) va ser la de disminuir. Tant les cèl·lules T CD4+ CCR5+ com les T CD8+ CCR5+ va disminuir significativament durant el tractament però l'expressió del coreceptor CCR5 en les cèl·lules T CD8+ en el *plateau*, es va mantenir significativament per sobre del nivell basal abans de qualsevol tractament (la mitja de les diferències 10.48,  $p < 0.0001$ ). Entre la setmana 0 i la 52 l'expressió de CXCR4 a les cèl·lules T CD4+ va augmentar significativament, en canvi l'expressió d'aquest coreceptor va disminuir significativament en les cèl·lules T CD8+.

Taula 8: Canvis en les subpoblacions de cèl·lules T CXCR4+ i CCR5+ en funció del període de tractament.

	Setmana 0-Basal <sup>1</sup>	Cicles STI <sup>2</sup>	Setmana 40-52 (DTI) <sup>3</sup>	Plateau/ Basal <sup>4</sup>	Plateau/Setmana 0 <sup>5</sup>	Plateau/ Setmana 40 <sup>6</sup>
<b>CD4+ CXCR4+</b>	-26.07 (13.36/38.79) <i>P=0.0005</i>	17.68 ±1.19 <i>P=0.0022</i>	16.74 ± 1.71 <i>P= 0.02</i>	4.87 (-8.83/18.57) <i>P= 0.47</i>	15.65 (8.65/22.65) <i>P&lt;0.0001</i>	8.9 (2.6/15.22) <i>P=0.0069</i>
<b>CD8+ CXCR4+</b>	-13.86 (4.38/23.34) <i>P=0.0071</i>	-13.17±1.25 <i>P=0.016</i>	-28.54 ± 3.9 <i>P=0.001</i>	-24.94 (15.39/34.50) <i>P&lt;0.0001</i>	-8.067 (2.14/14.01) <i>P=0.0093</i>	-2.72 (-9.4/4.003) <i>P=0.42</i>
<b>CD4+ CCR5+</b>	-5.01(1.89/8.13) <i>P=0.0038</i>	2.1±0.31 <i>P&lt;0.0001</i>	3.7±0.33 <i>P&lt;0.0001</i>	1.1 (3.5/5.7) <i>P= 0.62</i>	6 (3.54/8.47) <i>P&lt;0.0001</i>	3.92 (1.94/5.89) <i>P=0.0003</i>
<b>CD8+ CCR5+</b>	-3.21 (0.86/5.57) <i>P=0.0108</i>	5.94±0.5 <i>P&lt;0.0001</i>	6.88±0.68 <i>P&lt;0.0001</i>	10.48 (6.12/10.84) <i>P&lt;0.0001</i>	16.44 (13.28/19.6) <i>P&lt;0.0001</i>	9.057 (6.06/12.05) <i>P&lt;0.0001</i>

<sup>1</sup> Canvis en els percentatges durant el període amb TARGA, comparant els valors de la setmana 0 abans de començar les interrupcions estructurades del tractament (STI) amb el valor basal abans de qualsevol tractament t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

<sup>2</sup> AUC: Area sota la corba, mitja ± SE canvis durant el període de STI; P: test de Friedman

<sup>3</sup> AUC: mitja ± SE, canvis durant les 12 setmanes després de l'última interrupció del TARGA; P: test de Friedman.

<sup>4</sup> Canvis en els percentatges comparant els valors en el plateau (mitjana de totes les mesures disponibles des de la setmana 50 fins a la setmana 102) amb els valors basals; t-test: mitja de la diferència (CI 95%).

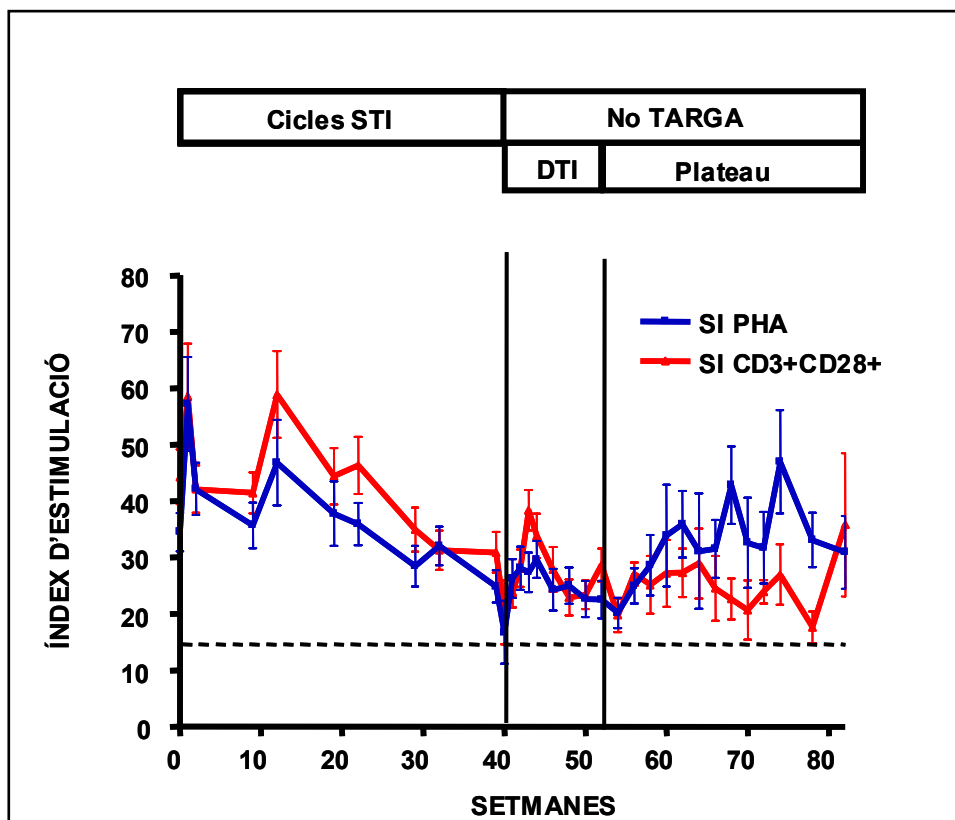
<sup>5</sup> Canvis en les percentatges comparant els valors en el plateau amb els valors a la setmana 0; t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

<sup>6</sup> Canvis en els percentatges comparant els valors en el plateau amb els valors a la setmana 40, el dia de l'última interrupció del TARGA; t-test: mitja de la diferència (CI 95%)

NP: Not performed at baseline

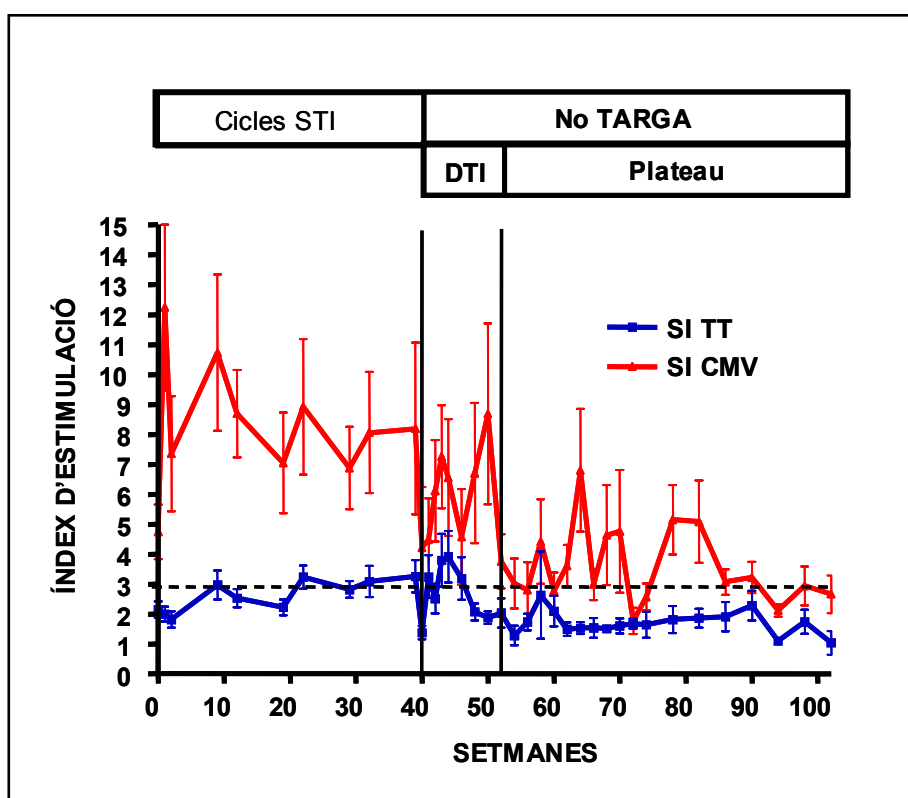
### 5.1.3.2 Resposta limfoproliferativa

- La resposta proliferativa a mitògens tals com la PHA i als anticossos anti-CD3 i anti-CD28 va disminuir significativament entre la setmana 0 i la setmana 52 ( $p < 0.002$  per totes les comparacions).



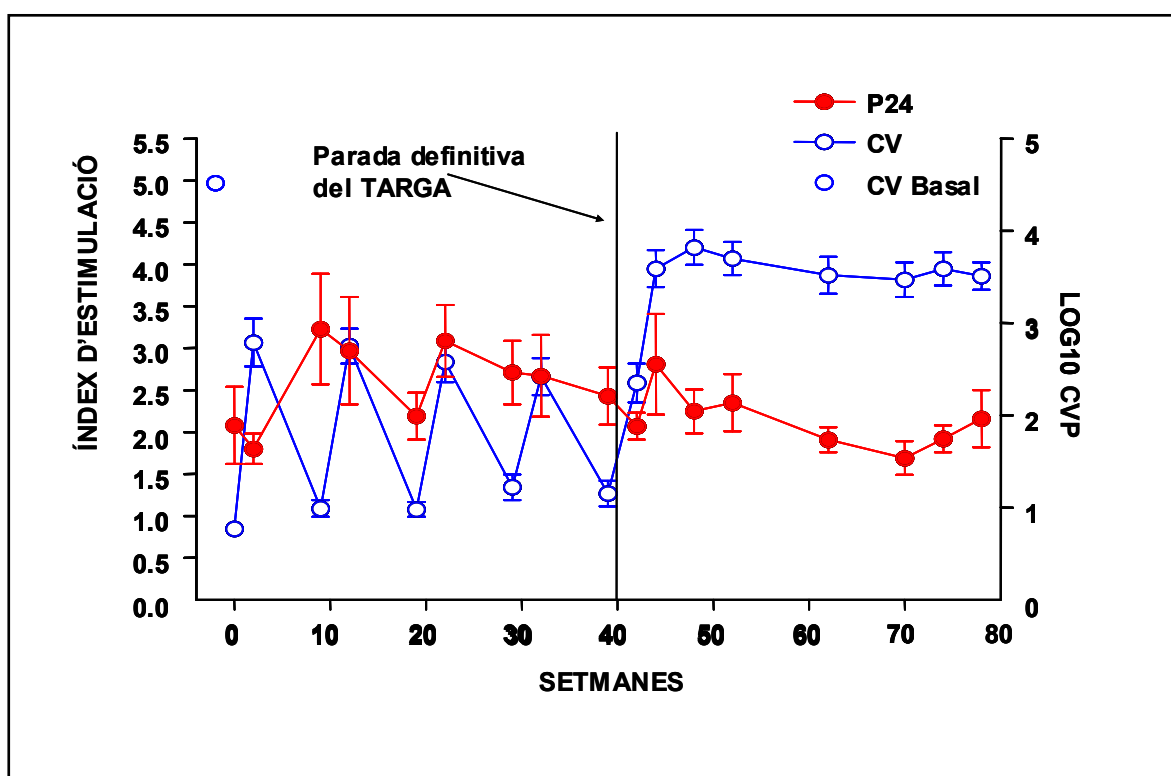
**Figura 7. Resposta limfoproliferativa a mitògens.** Canvis en la mitja +/- SE de l'índex d'estimulació contra mitògens (PHA; CD3 + CD28) durant els cicles de STI, durant la interrupció definitiva del tractament i durant el plateau

- Si ens fixem, en canvi, en la resposta proliferativa a antigens tals com el toxoide tetànic o antigens del CMV, es va observar que l'índex d'estimulació contra el TT va augmentar significativament durant els cicles de STI ( $p = 0.02$ ); tot i així la resposta a aquest antigen de record va disminuir després de la interrupció definitiva del TARGA. La resposta proliferativa al CMV va disminuir significativament durant tots els períodes de les interrupcions ( $p = 0.05$ ).



**Figura 8. Resposta limfoproliferativa a TT i CMV.** Canvis en la mitja  $\pm$  SE de l'índex d'estimulació contra antigens de record i ubics durant els cicles de STI, durant la interrupció definitiva del tractament i durant el plateau

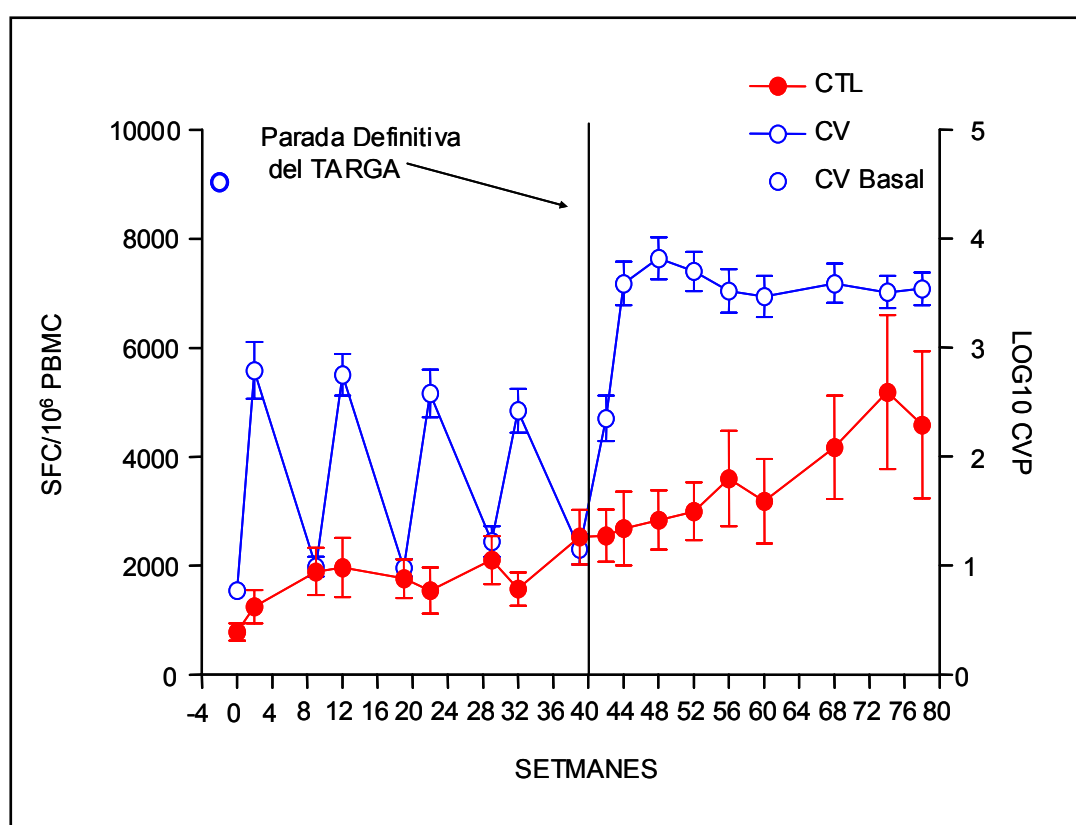
- La resposta limfoproliferativa a les proteïnes del VIH van ser les següents: es va observar un augment significatiu de l'índex d'estimulació contra l'antigen p24 ( $p = 0.001$ ). Aquest augment es va observar principalment durant el segon i el quart cicle de STI. En canvi, a la setmana 52, la resposta limfoproliferativa de les cèl·lules T CD4+ va ser dèbil i transitòria en tots els pacients i no es va poder correlacionar amb la càrrega viral plasmàtica ( $r = 0.107$ ,  $p = 0.17$ ).



**Figura 9. Resposta limfoproliferativa a l'antigen p24 del VIH-1.** Canvis en la mitja  $\pm$  SE de l'índex d'estimulació contra l'antigen p24 durant els cicles de STI, durant la interrupció definitiva del tractament i durant el plateau; també hi ha representada la dinàmica de la mitja  $\pm$  SE de la CVP durant els cicles de STI i durant l'última interrupció del TARGA. La mitja de la CV Basal està representada per un punt.

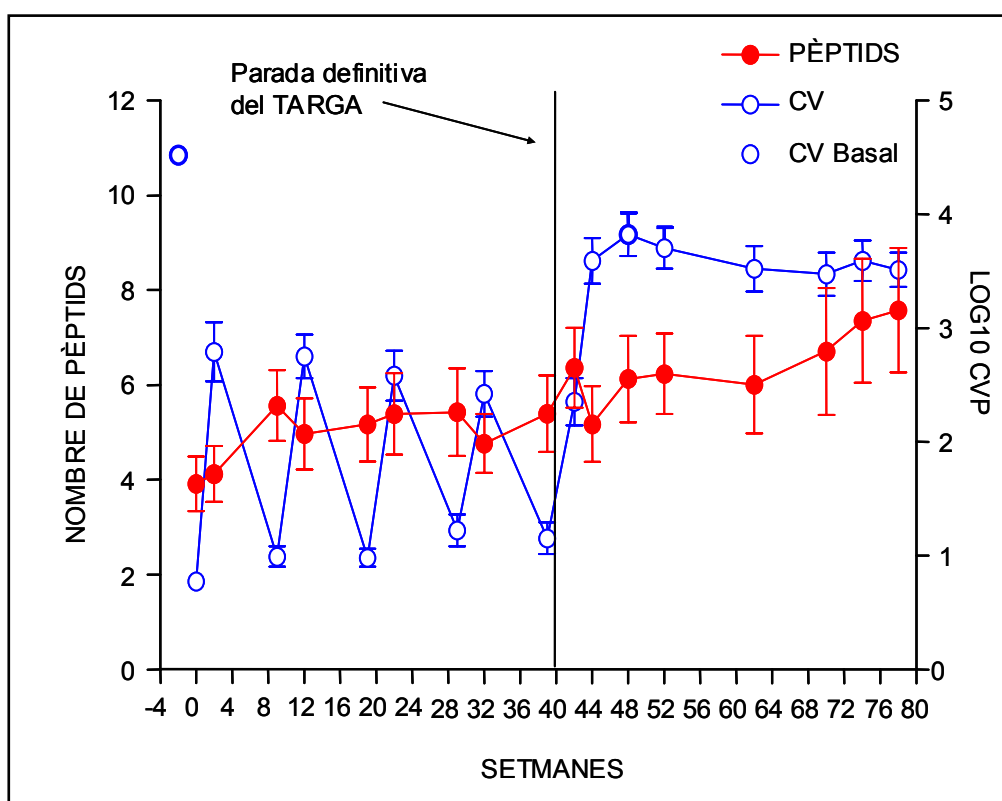
### 5.1.3.3 Respostes CD8+ específiques contra el VIH

- Resposta CD8+ específiques anti-VIH totals (magnitud de la resposta): les dades que es van obtenir van mostrar un augment significatiu de la magnitud de la resposta des de la setmana 0 fins a la setmana 52 (12 setmanes després de l'última interrupció del TARGA) ( $p < 0.0001$ ). Aquest augment es va mostrar principalment després de l'última interrupció del TARGA. La mitja de l'AUC de l'increment de la magnitud de la resposta CTL va ser de  $1985 \pm 334$  SFC/ $10^6$  PBMC. Cal esmentar que tot i que la CV es va estabilitzar després de la setmana 52 (després de l'última interrupció del TARGA, la resposta de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques no ho va fer, ens el contrari, va anar augmentant fins al final del seguiment dels pacients, per tant no es va poder correlacionar amb la CVP ( $r = 0.01$ ,  $p = 0.88$ ).



**Figura 10. Magnitud de la resposta CTL.** Dinàmica de la mitjana +/- SE de la resposta de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques (SFC/10<sup>6</sup> PBMC) i dinàmica de la mitjana +/- SE de la CVP durant els cicles de STI i durant l'última interrupció del TARGA. La mitja de la CV Basal està representada per un punt.

- Nombre de pèptids reconeguts (amplitud de la resposta): les dades van demostrar que des del dia 0 (primer dia del primer cicle) fins a la setmana 52 es va produir un augment de l'amplitud de la resposta ( $p < 0.0001$ ). Aquest augment es va observar principalment després de l'última interrupció del TARGA. La mitja de l'AUC de l'increment de l'amplitud de la resposta CTL va ser de  $2.8 \pm 0.32$  pèptids. Tot i així, a l'igual que vam observar amb la magnitud de la resposta CTL, l'amplitud d'aquesta resposta tampoc es va poder correlacionar amb la CV plasmàtica ( $r = 0.001$ ,  $p = 0.99$ ). La resposta CTL contra els epítops de gag, pol i nef van predominar respecte la resposta específica contra els epítops de env.



**Figura 11. Amplitud de la resposta CTL.** Dinàmica de la mitjana +/- SE de la resposta de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques /SFC/106 SFC) i dinàmica de la mitjana +/- SE de la CVP durant els cicles de STI i durant l'última interrupció del TARGA. La mitja de la CV Basal està representada per un punt.



#### **5.1.4 Variables virològiques i immunològiques**

Després d'un estudi de regressió múltiple, es va observar que la càrrega viral plasmàtica va ser independent i negativament relacionada amb el percentatge de les cèl·lules T CD4+ ( $p < 0.0001$ ) i amb l'índex d'estimulació contra l'antigen p24 del VIH-1. En canvi, la CV plasmàtica es va poder correlacionar de manera positiva amb el percentatge de cèl·lules T CD8+ ( $p = 0.008$ ) i amb la freqüència de les respostes CD8+ anti-VIH totals (definides com la suma de les respostes individuals per pacient) ( $p = 0.003$ ). En canvi, l'amplitud de la resposta de les cèl·lules T CD8+ no es va poder relacionar amb la CV plasmàtica.

## **5.2 ESTUDI VACUNA TERAPÈUTICA**

### **5.2.1 Característiques dels pacients**

En general no existien diferències importants entre el grup de pacients vacunats i el grup control, excepte en la CV basal que en els controls era inferior a la dels pacients. Els pacients inclosos tenien una mitja d'edat de 40 anys (rang 29-56), en canvi la mitja d'edat dels controls era de 43 anys (rang 35-58).

Tots els pacients eren portadors del VIH-1 i la mitja de la CV plasmàtica basal va ser de 4.44 còpies/mL (rang 4.02-5.22 còpies/mL). La mitja de limfòcits T CD4+ basal va ser de 754 cèl·lules/mm<sup>3</sup> (rang 588-1005/mm<sup>3</sup>).

Resultats

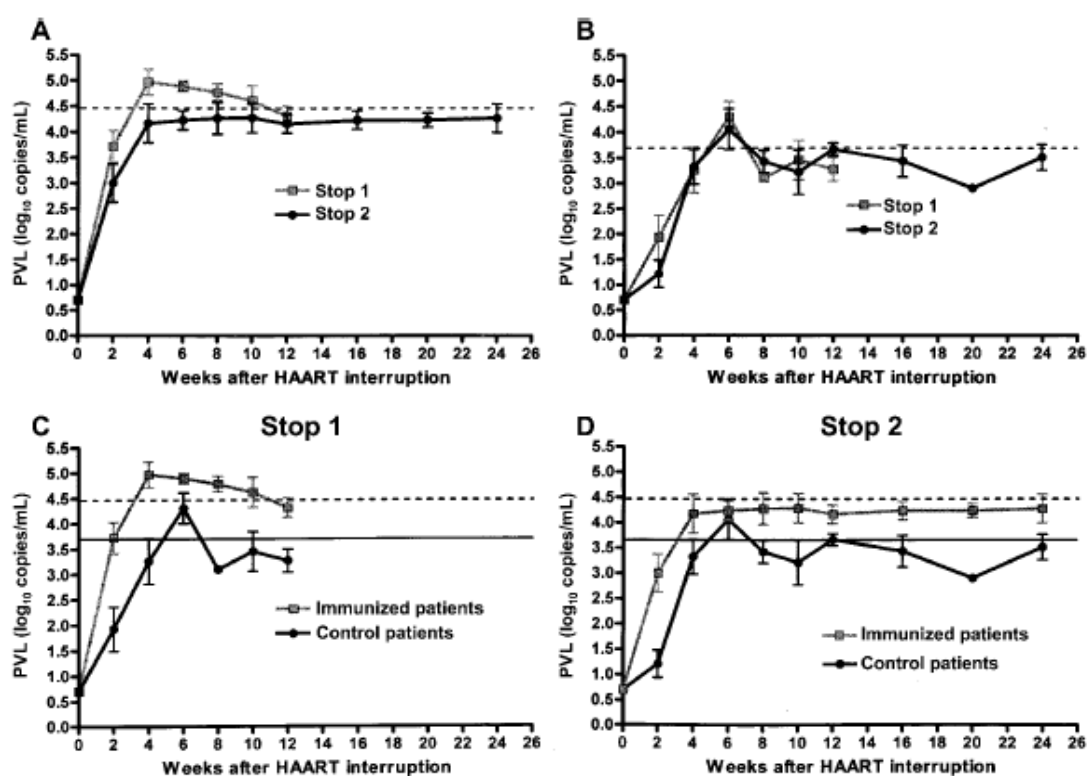
Número pacient	Sexe	Edat (Anys)	Cèl·lules T CD4/mm <sup>3</sup> basals	ARN del VIH-1 obtingut per plasmafèresis per pulsar les CD (log <sub>10</sub> còpies/ml)	Càrrega viral plasmàtica (log <sub>10</sub> còpies/ml)		Temps de duplicació del rebot (dies)		Àrea sota la corba del rebot de la càrrega viral*		Pic del rebot de la càrrega viral*	
					Basal	Setmana 54	Stop 1	Stop 2	Stop 1	Stop 2	Stop 1	Stop 2
<b>Casos</b>												
269	Home	29	793	7.19	4.24	3.30	1.89	2.33	3.39	2.52	5.16	5.30
262	Home	45	707	7.90	4.58	3.90	1.76	3.95	3.28	1.40	5.07	3.09
46	Home	56	614	8.22	4.51	3.79	2.67	3.36	3.67	2.61	5.75	4.56
185	Dona	32	628	8.20	5.10	4.43	1.78	2.59	3.47	3.07	5.00	4.55
261	Home	30	781	7.07	4.12	4.12	2.23	2.80	2.29	3.20	4.94	4.46
201	Home	54	588	7.42	3.94	3.92	1.79	3.46	2.82	2.40	5.40	4.51
168	Home	37	1005	7.63	4.15	4.67	1.96	5.02	3.16	2.15	4.89	4.93
33	Home	48	763	7.56	4.65	4.80	1.37	1.83	3.48	2.96	6.37	4.92
158	Home	47	764	7.14	4.02	4.03	1.77	2.73	3.27	3.04	5.35	4.67
265	Home	28	759	9.11	5.22	5.03	1.82	1.69	4.03	3.93	6.15	5.67
213	Home	31	948	7.49	4.60	4.63	1.54	1.78	3.55	3.11	5.70	5.42
207	Home	48	706	7.98	4.11	4.70	2.76	2.30	3.32	3.36	5.14	4.96
Mitja		40	754	7.74	4.44	4.27	1.9	2.8	3.32	2.87	5.41	4.75
SE		3	36	0.16	0.12	0.15	0.12	0.28	0.13	0.19	0.14	0.18
<b>Controls</b>												
228	Dona	43	879		3.07	3.01	6.51	5.14	1.93	1.76	3.86	4.23
282	Home	58	619		3.74	3.43	5.55	4.95	1.67	1.56	3.89	4.08
296	Home	35	900		3.64	3.36	4.70	4.08	2.15	2.61	3.96	3.80
105	Home	39	504		3.73	3.54	2.70	2.56	2.48	3.33	5.19	5.09
Mitja		43	725		3.54	3.34	4.86	4.18	2.06	2.31	4.22	4.30
SE		5	97		0.16	0.11	0.81	0.58	0.17	0.41	0.32	0.28

\*Calculat amb les dades de les 12 primeres després de la interrupció

**Taula 9.** Característiques dels casos i controls, canvis de la càrrega viral plasmàtica, i el total de virus obtingut de les plasmafèresis dels casos, utilitzat per pulsar les cèl·lules dendrítiques. Els pacients en blau són els 4 pacients anomenats responedors.

### 5.2.2 Efectes de la vacuna terapèutica de cèl·lules dendrítiques sobre la càrrega viral

Es va observar una disminució del set-point de la càrrega viral plasmàtica major o igual a 0.5 logs en el 30% dels individus immunitzats (4 dels 12 pacients), mentre que no es va observar cap canvi en el grup control. També es va comparar la dinàmica en el rebot de la CV en els dos períodes d'interrupció del tractament, observant-se un enlentiment en la mitja del temps de duplicació de la CV plasmàtica en el grup vacunat durant la segona interrupció del tractament (STOP2) ( $p = 0.01$ ), i una disminució significativa de l'àrea sota la corba ( $p = 0.02$ ) i de la xifra màxima de CV plasmàtica ( $p = 0.004$ ) en la segona interrupció també en el grup vacunat, mentre que no es varen observar diferències en aquest paràmetres en la primera i la segona interrupció del tractament en el grup control.



**Figura 12.** Rebot de la càrrega viral plasmàtica després de la primera i segona interrupció del tractament antiretroviral (prèvia i posterior a la vacunació, respectivament) en individus amb infecció crònica per VIH vacunats amb CD autòlogues pulsades amb VIH autòleg complet i inactivat amb calor. (A) Mitja de les CVP dels pacients immunitzats; (B) Mitja de les CVP dels individus control; (C) Mitja de les CVP dels individus immunitzats i dels pacients control després de l'STOP1; (D) Mitja de les CVP dels individus immunitzats i dels pacients control després de l'STOP2. (García et al., JID 2005)

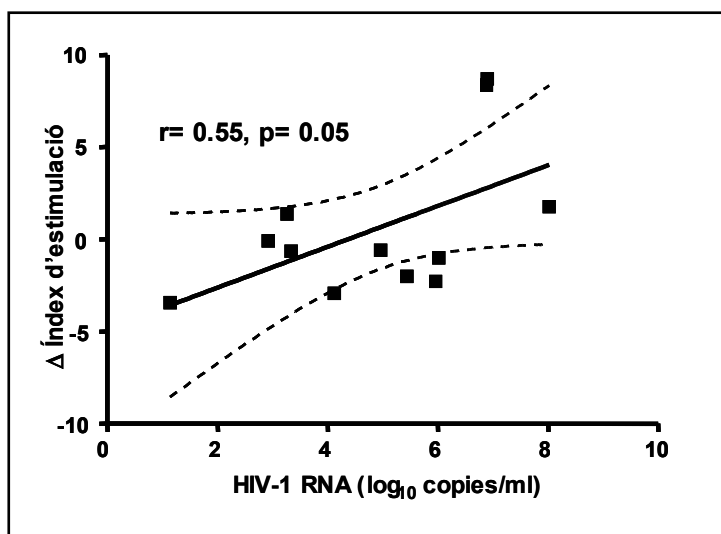
### **5.2.3 Efectes de la vacuna terapèutica de cèl·lules dendrítiques sobre els limfòcits T**

#### **5.2.3.1 Subpoblacions limfocitàries**

- El percentatge de cèl·lules T CD4+ durant les successives immunitzacions i després d'aquestes, no va variar significativament ( $p = 0.57$ ) (mitja +/- SE de cèl·lules T CD4+ va ser de 32 +/- 2.1 a la setmana 0 i de 35 +/- 2.2 a la setmana 30).
- El percentatge de cèl·lules T CD8+ durant les successives immunitzacions i després d'aquestes, tampoc va variar significativament ( $p = 0.54$ ) (mitja +/- SE de cèl·lules T CD8+ va ser de 38 +/- 1.9 a la setmana 0 i de 43 +/- 2.6 a la setmana 30).
- Tampoc es van trobar canvis en els percentatges de cèl·lules T CD4+ i T CD8+ en els individus control.
- Es va trobar un augment significatiu ( $p = 0.004$ ) de les cèl·lules T CD4+ naïve (mitja +/- SE va ser de 20 +/- 2.6 a la setmana 0 i de 31 +/- 4.1 a la setmana 30).
- També es va trobar un augment significatiu ( $p = 0.04$ ) de les cèl·lules T CD8+ CD28+ (mitja +/- SE va ser de 53 +/- 2.5 a la setmana 0 i de 59 +/- 2.9 a la setmana 30).

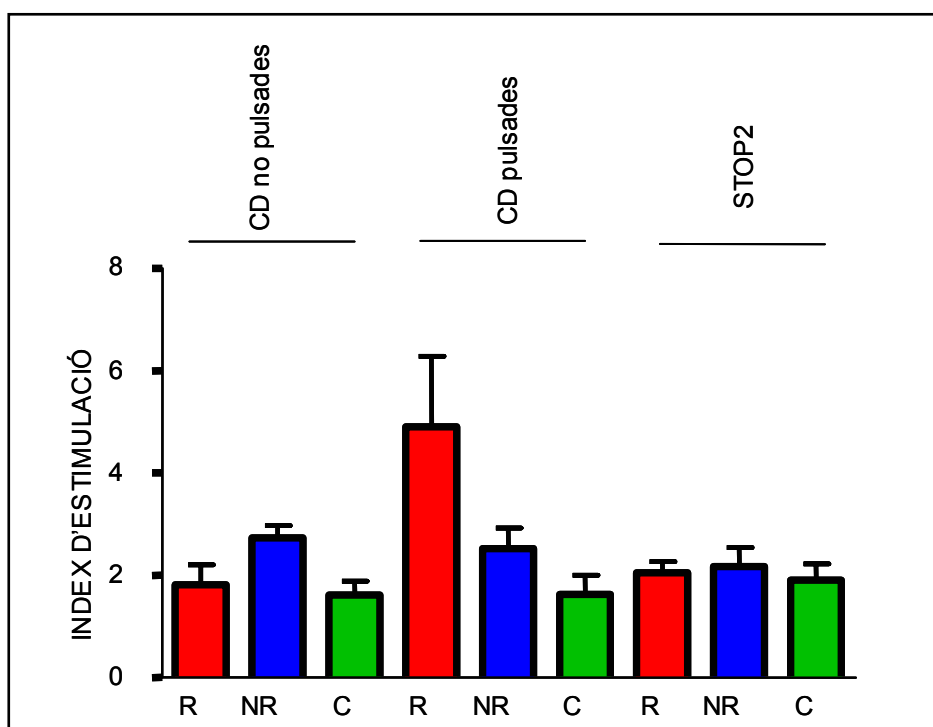
#### **5.2.3.2 Resposta limfoproliferativa**

La resposta limfoproliferativa a l'antigen p24 va augmentar de manera dèbil i no significativa després de les dues primeres immunitzacions. Cal destacar que els pacients responedors (pacients que van presentar un set-point de la CV de com a mínim 0.5 log per sota de la CV basal) van presentar un augment dèbil però significatiu de la resposta limfoproliferativa durant les immunitzacions, si ho comparem amb els pacients no responedors (pacients que no van presentar cap canvi en el seu set-point viral). L'augment de la resposta limfoproliferativa es va poder correlacionar amb la quantitat de virus VIH-1 que s'havia obtingut durant les successives plasmafèresis, i que per tant van ser utilitzades per polsar les CDs ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.05$ ) (Figura 13).

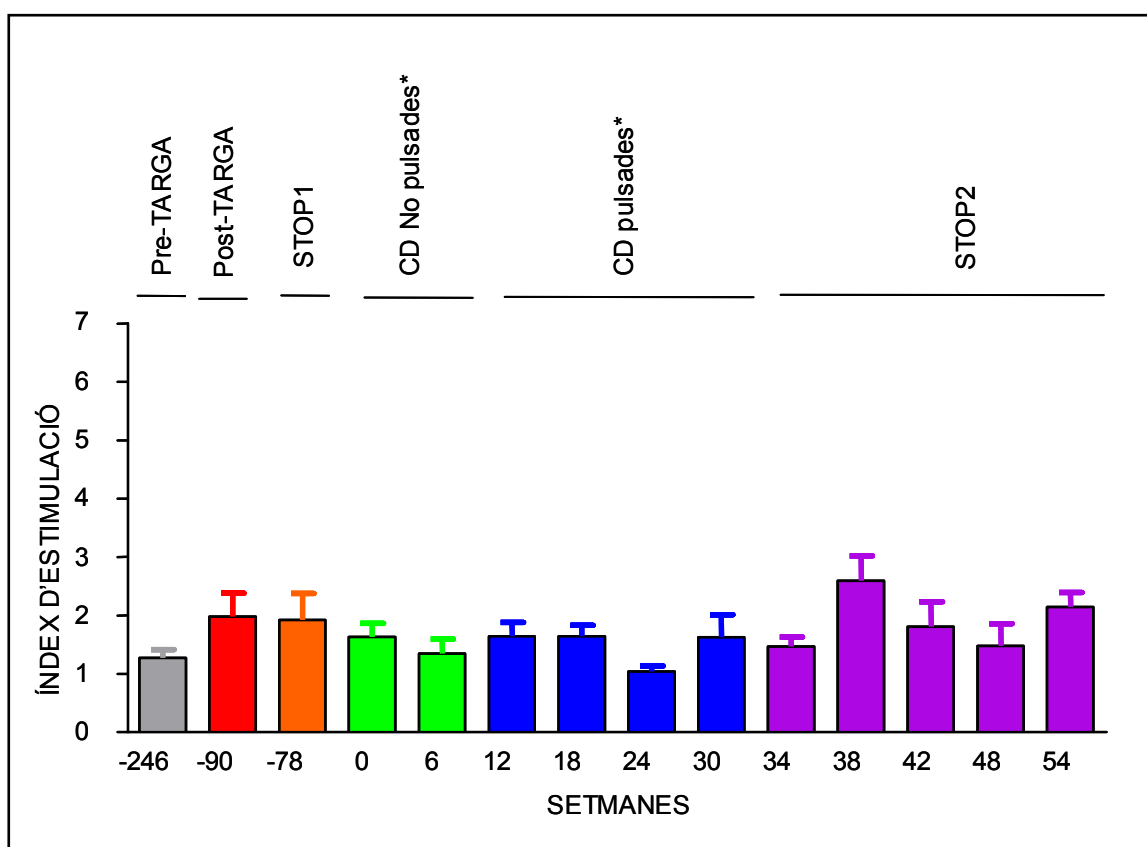


**Figura 13.** Corelació entre la quantitat de VIH-1 obtingut durant les plasmafèsis i la resposta limfoproliferativa contra l'antigen p24

S'ha observat també una correlació negativa directa entre la resposta limfoproliferativa i la resposta de les cèl·lules T CD8+ després de les immunitzacions ( $r = 0.52$ ,  $p = 0.05$ ). Després de la interrupció del TARGA, l'augment de la resposta limfoproliferativa en el grup dels pacients responedors, no es va mantenir (Figura 14) No es van trobar canvis en la resposta limfoproliferativa dels controls (Figura 14 i 15).



**Figura 14.** Resposta limfoproliferativa dels individus control (C) i dels individus immunitzats (R de responedors i NR de no responedors).



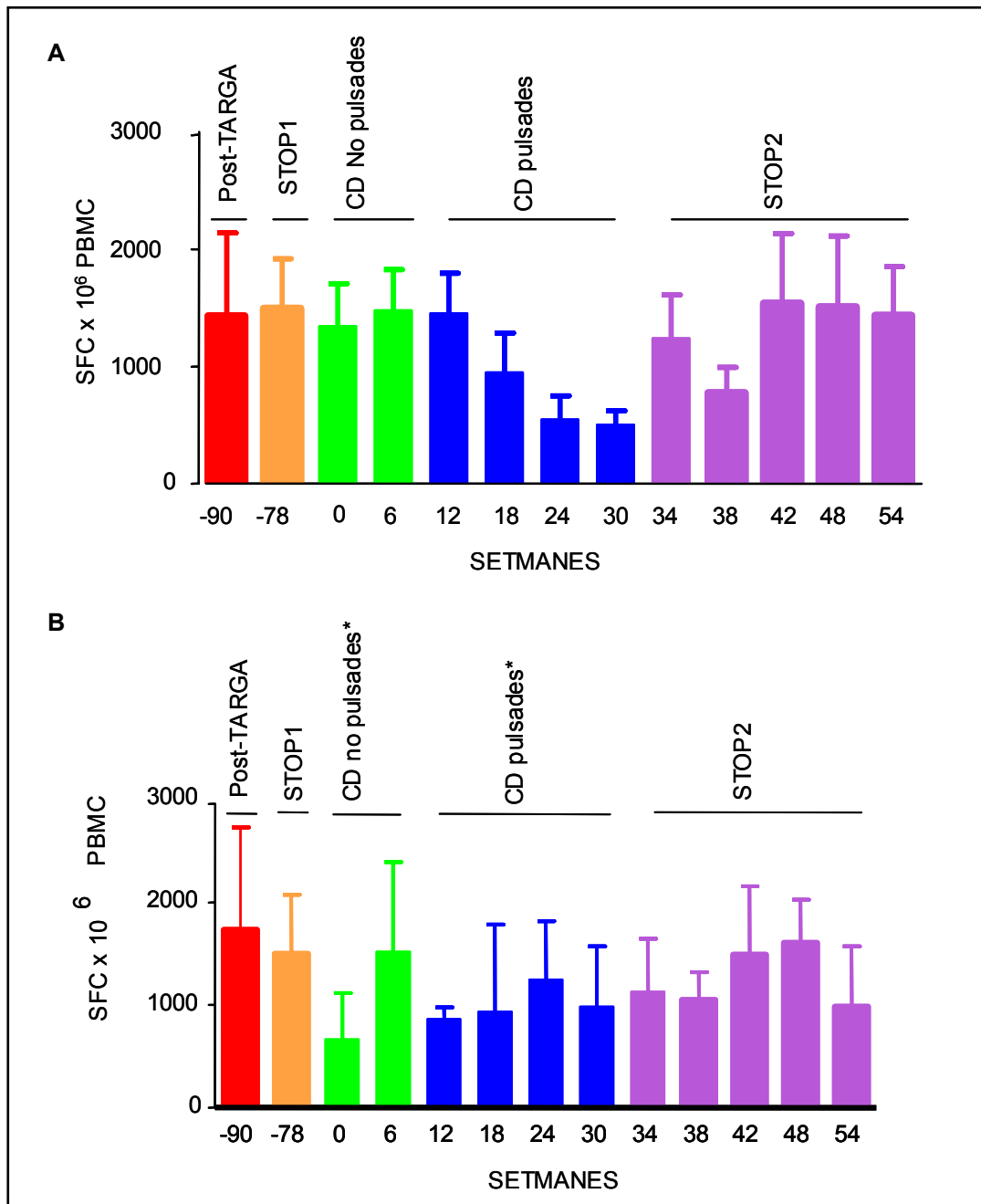
**Figura 15.** Resposta limfoproliferativa a l'antigen p24 del VIH-1 (mitja +/- SE de l'índex d'estimulació) dels individus control no immunitzats.

### 5.2.3.3 Resposta CD8+ específica contra el VIH

- Els resultats de la resposta CTL demostren que, a la setmana 0 abans de les immunitzacions, 10 dels 12 pacients tenien una resposta de les cèl·lules T CD8 entre moderada i forta; aquesta resposta va ser similar a la que es va donar durant els períodes previs a l'STOP1 i durant l'STOP1 mateix (Figura 16 a i b). En canvi, durant les immunitzacions, tant la magnitud com l'amplitud de la resposta total de les cèl·lules T CD8+ va anar disminuint. La mitjana de les freqüències de les respostes CTL a la setmana 0 i durant les immunitzacions (a les setmanes 6, 12, 18, 24 i 30) va ser de: 1347, 1482, 1456, 948, 548, 504 SFC/106 PBMCs respectivament ( $p = 0.0008$ ). El nombre de pèptids reconegut per pacient (conegut com l'amplitud de la resposta) va disminuir des d'una



mitjana de 6 pèptids (rang entre 1-17) a la setmana 0, a 2 pèptids (rang de 0-9) a la setmana 30 ( $p = 0.0008$ ). La resposta de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> es va anar recuperant progressivament després de l'STOP2 fins assolir nivells pròxims als obtinguts abans de les immunitzacions.



**Figura 16.** Resposta de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> mesurada per la producció d'IFN- $\gamma$  mitjançant la tècnica de l'ELISPOT (mitja  $\pm$  SE del nombre de cèl·lules formadores d'spots). (A) pacients immunitzats amb la vacuna de cèl·lules dendrítiques pulsades amb virus autòleg. (B) individus control.

#### **5.2.4 Característiques fenotípiques i funcionals de les cèl·lules T CD8+ VIH-específiques després d'immunització terapèutica amb la vacuna de cèl·lules dendrítiques.**

##### **5.2.4.1 Característiques fenotípiques de les cèl·lules T CD8+ VIH-específiques**

- Quan vam analitzar els nivells de cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+, Tet-Pol+ i Tet-CMV+ tant dels pacients immunitzats com dels pacients control ens vam trobar els següents resultats: en el 60% dels pacients immunitzats (6 dels 10 analitzats) es van detectar cèl·lules T CD8+ Tet+ (la mínima freqüència detectada va ser de 0.02% de les cèl·lules T CD8+ gatejades). D'aquest 6 pacients, 2 (#201, #262) tenien cèl·lules T CD8+ Gag+, uns altres dos (#168, #261) tenien cèl·lules T CD8+ Pol+ i per últim, 2 (#158, #185) pacients presentaven tant cèl·lules T CD8+ Gag+ com cèl·lules T CD8+ Pol+. Les freqüències d'aquestes cèl·lules T CD8+ Tet+ es van mantenir durant el període d'immunitzacions i en 4 dels 6 pacients van augmentar després d'interrompre el tractament. El rang de percentatges de cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+ detectat va anar des del 0.04% fins al 1.85%, en canvi per les cèl·lules T CD8+ Tet-Pol+ va anar de 0.02% a 0.60%. No es van poder detectar cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques en cap dels pacients control. En 4 (#158, #185, #261, #269) de 10 pacients es van detectar, també, cèl·lules T CD8+ CMV+, tot i que en aquest cas les freqüències no van variar al llarg de l'estudi. En tots els controls estudiats es van detectar cèl·lules T CD8+ CMV+.

SUBJECTS TET Gag	PRE	DC0	DC1	DC2	DC3	DC4	POST
158	0.08	0.13	0.11	0.11	0.11	0.11	0.32
168	-	-	-	-	-	-	-
185	0.72	0.48	0.43	0.49	0.49	0.53	1.85
201	0.30	0.19	0.23	0.47	0.15	0.15	0.56
207	-	-	-	-	-	-	-
213	-	-	-	-	-	-	-
261	-	-	-	-	-	-	-
262	0.04	0.11	0.12	0.08	0.13	0.11	0.04
269	-	-	-	-	-	-	-

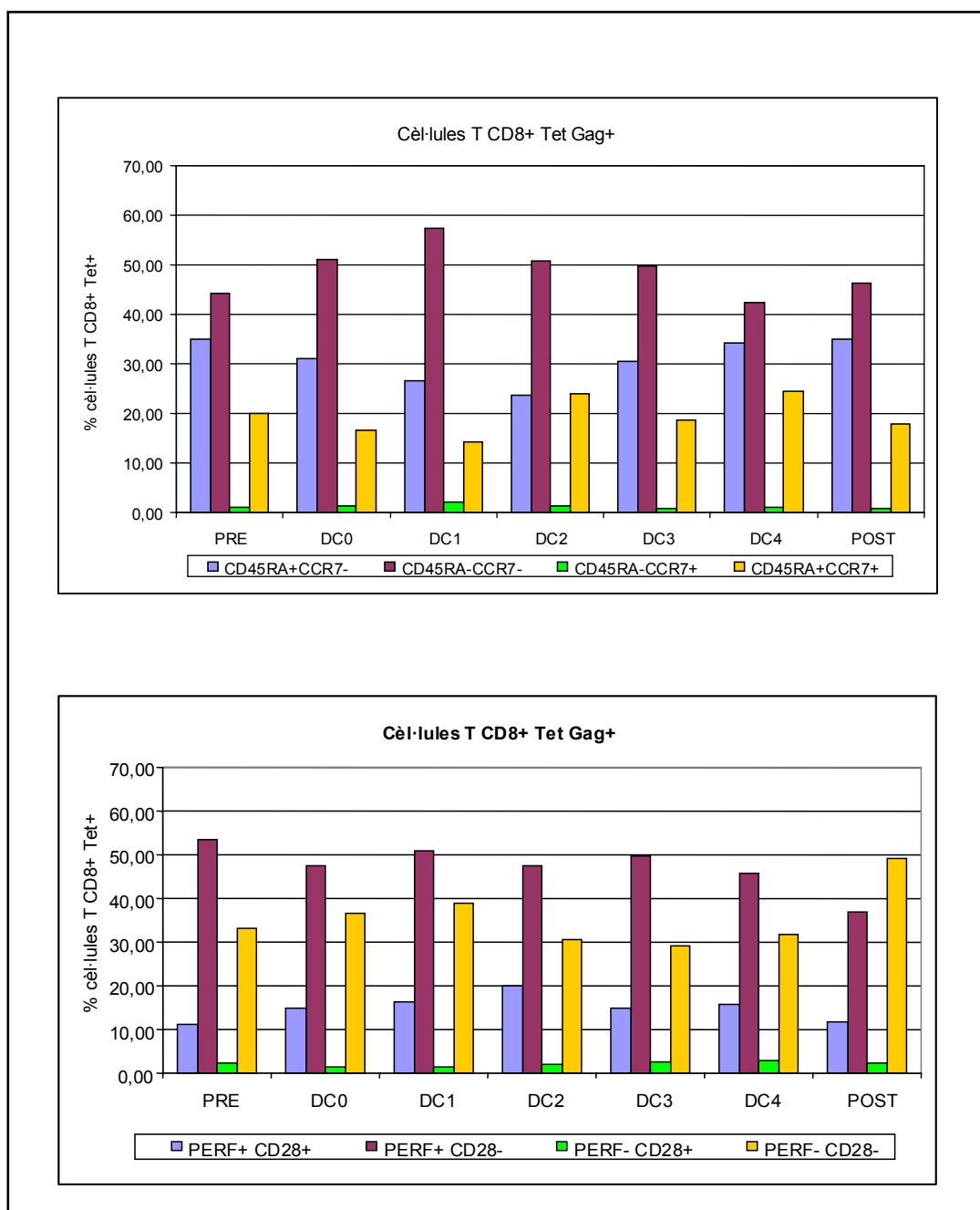
SUBJECTS TET Pol	PRE	DC0	DC1	DC2	DC3	DC4	POST
158	0.10	0.08	0.06	0.11	0.11	0.09	0.13
168	0.09	0.02	0.04	0.02	0.05	0.02	0.05
185	0.22	0.24	0.28	0.24	0.22	0.23	0.60
207	-	-	-	-	-	-	-
213	-	-	-	-	-	-	-
261	0.18	0.16	0.20	0.18	0.13	0.27	0.34
262	-	-	-	-	-	-	-
265	-	-	-	-	-	-	-
269	-	-	-	-	-	-	-

SUBJECTS TET CMV	PRE	DC0	DC1	DC2	DC3	DC4	POST
158	0.12	0.13	0.13	0.12	0.16	0.13	0.17
185	0.70	0.70	0.79	0.87	0.84	0.94	0.49
207	-	-	-	-	-	-	-
213	-	-	-	-	-	-	-
261	2.21	2.26	2.33	2.20	2.69	2.61	2.62
262	-	-	-	-	-	-	-
269	0.42	0.28	0.31	0.30	0.39	0.33	0.60

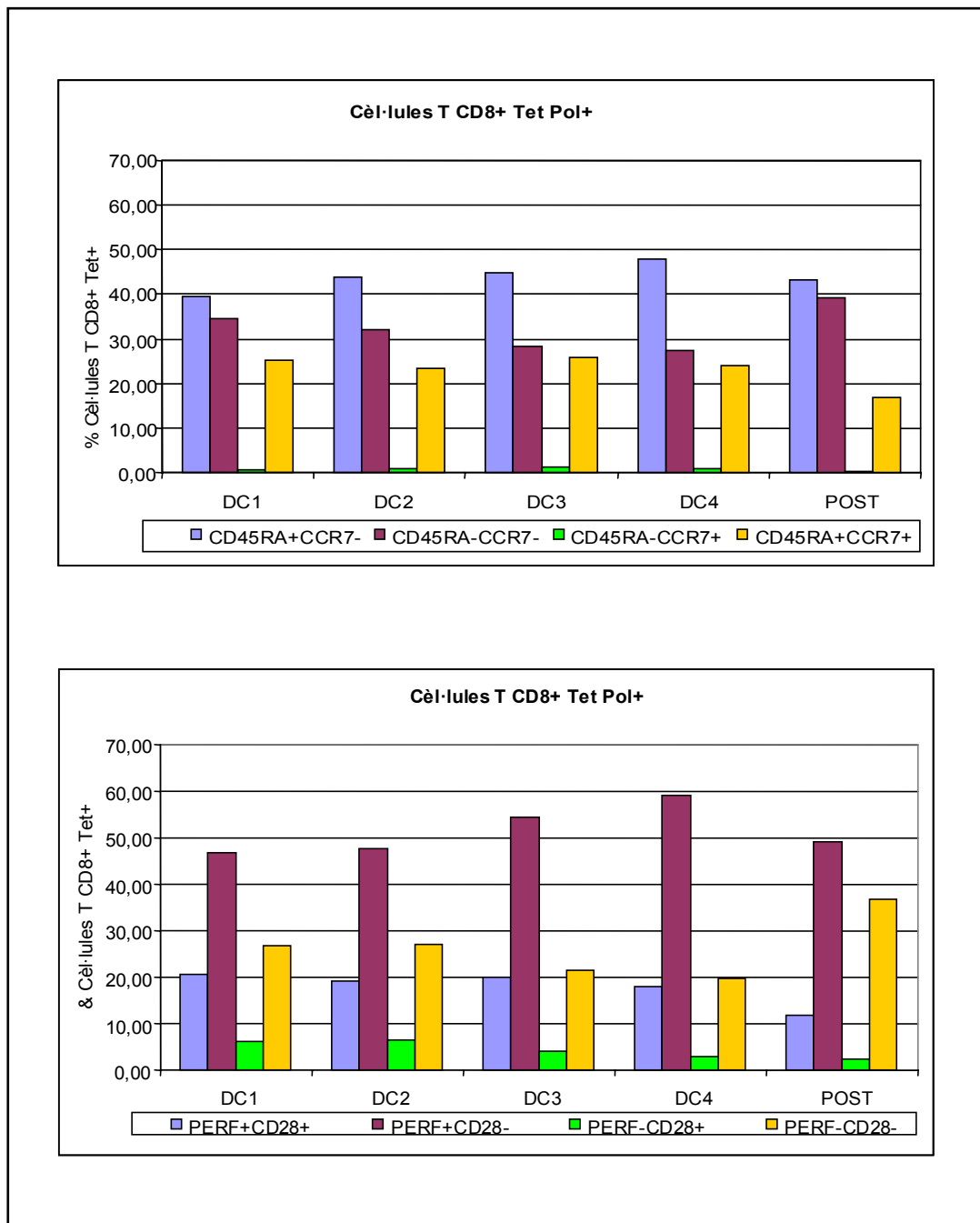
CONTROLS TET Gag	PRE		POST
166	-	-	-
228	-	-	-
282	-	-	-
296	-	-	-
CONTROLS TET Pol	PRE		POST
166	-	-	-
228	-	-	-
282	-	-	-
296	-	-	-
CONTROLS TET CMV	PRE		POST
166	0.11	0.28	0.16
228	0.13	0.13	0.13
282	0.39	0.37	0.35
296	0.74	0.78	0.71

**Taula 10.** Freqüències de les cèl·lules T CD8+ VIH-1 i CMV específiques dels pacients i dels controls inclosos en l'estudi. (-) → negatiu

• Estat de maduració i diferenciació de les cèl·lules T CD8+ VIH-1 i CMV-específiques: es va trobar una elevada heterogeneïtat entre pacients; tant les cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+ com les Tet-Pol+ van presentar principalment un fenotip memòria efector (CD45RA-CCR7-) i/o efector terminal (CD45RA+CCR7-) així com eren també CD28- i perforina+/- . Entre el 42-57% de les cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+ van ser CD45RA-CCR7-, mentre que el fenotip CD45RA+CCR7- el van presentar entre el 23-35% de les cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+. En el cas de les cèl·lules T CD8+ Tet-Pol+ entre el 27-42% van ser CD45RA-CCR7- i entre el 40-48% CD45RA+CCR7-. Cal comentar també que la majoria de cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+ i Tet-Pol+ eren preferentment CD28- i perforina+. Del 37-57% de les cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+ van ser CD28-Perf+, i del 29-49% van ser CD28-Perf-. Pel que fa a les cèl·lules T CD8+ Tet-Pol+, del 47-59% van ser CD28-Perf+, i del 20-36% van ser CD28-Perf-. La majoria de cèl·lules T CD8+ CMV+ detectades tant en els pacients immunitzats com en el grup control van presentar , un fenotip memòria efector i/o memòria efector, així com CD28- i perforina+; els percentatges obtinguts van ser els següents: les de fenotip CD45RA-CCR7- presentaven un rang del 39-45%, en canvi el rang de les de fenotip CD45RA+CCR7- va ser del 40-49%; les CD28-Perf+ van representar del 36-51% de la població.



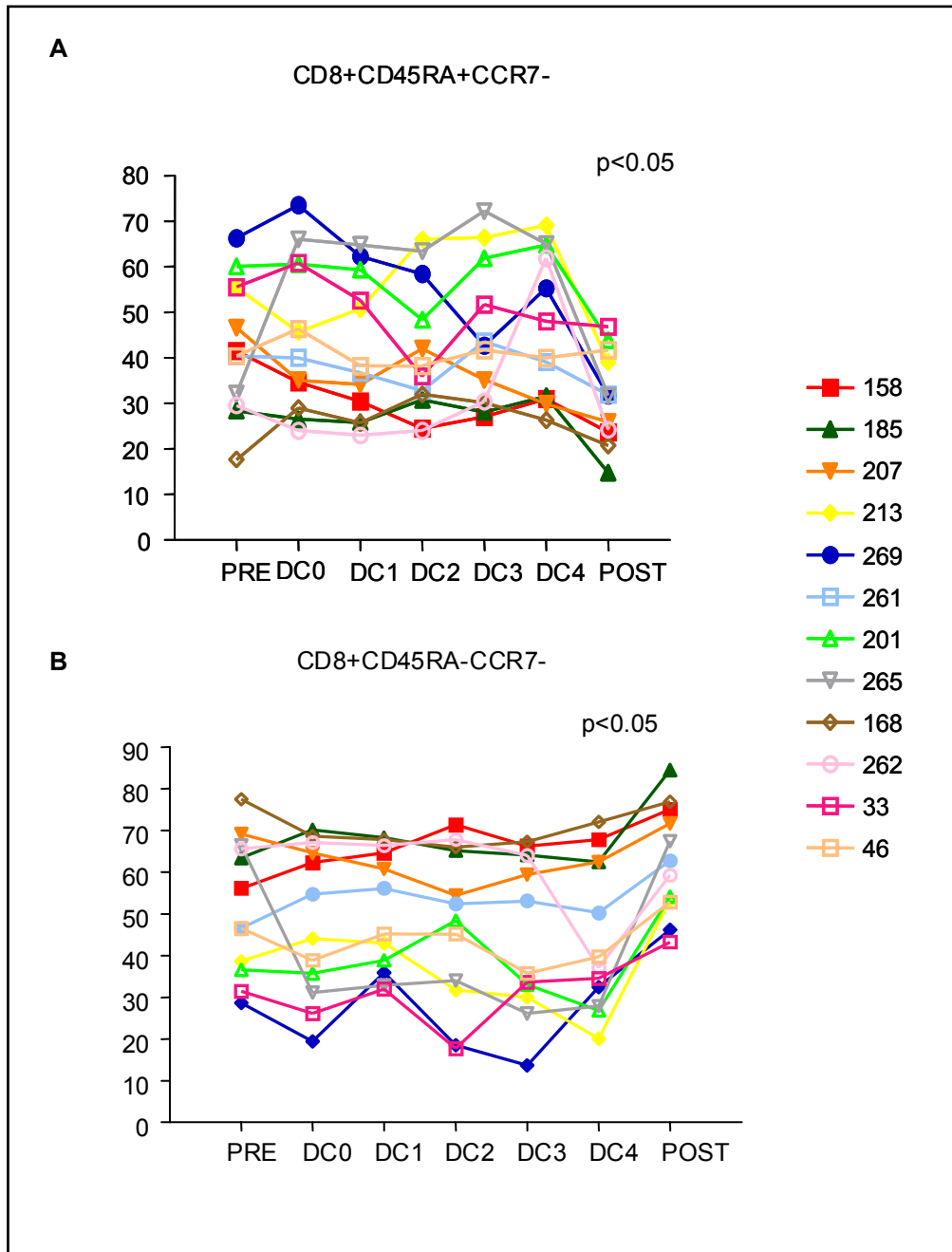
**Figura 17.** Immunofenotip de les cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+. Les cèl·lules T CD8+ naïve s'han definit com CD45RA+CCR7+CD28+Perforin-; les memòria central CD45RA-CCR7+CD28+/-Perforin-; les memòria efectores CD45RA-CCR7-CD28-Perforin+/- i les efectores (les que ja estan del tot diferenciades) CD45RA+CCR7-CD28-Perforin+. Els diferents percentatges de les subpoblacions definides anteriorment es representen com el percentatge de la mitjana de les cèl·lules T CD8+ Tet Gag+ gatejades.



**Figura 18.** Immunofenotip de les cèl·lules T CD8+ Tet-Pol+. Les cèl·lules T CD8+ naïve s'han definit com CD45RA+CCR7+CD28+Perforin-; les memòria central CD45RA-CCR7+CD28+/-Perforin-; les memòria efectores CD45RA-CCR7-CD28-Perforin+/- i les efectores (les que ja estan del tot diferenciades) CD45RA+CCR7-CD28-Perforin+. Els diferents percentatges de les subpoblacions definides anteriorment es representen com el percentatge de la mitjana de les cèl·lules T CD8+ Tet Pol+ gatejades.

- Cal dir que quan ens vam fixar amb les cèl·lules T CD8+ totals, vam obtenir els següents resultats: després de les vacunacions i en el moment en el qual es va

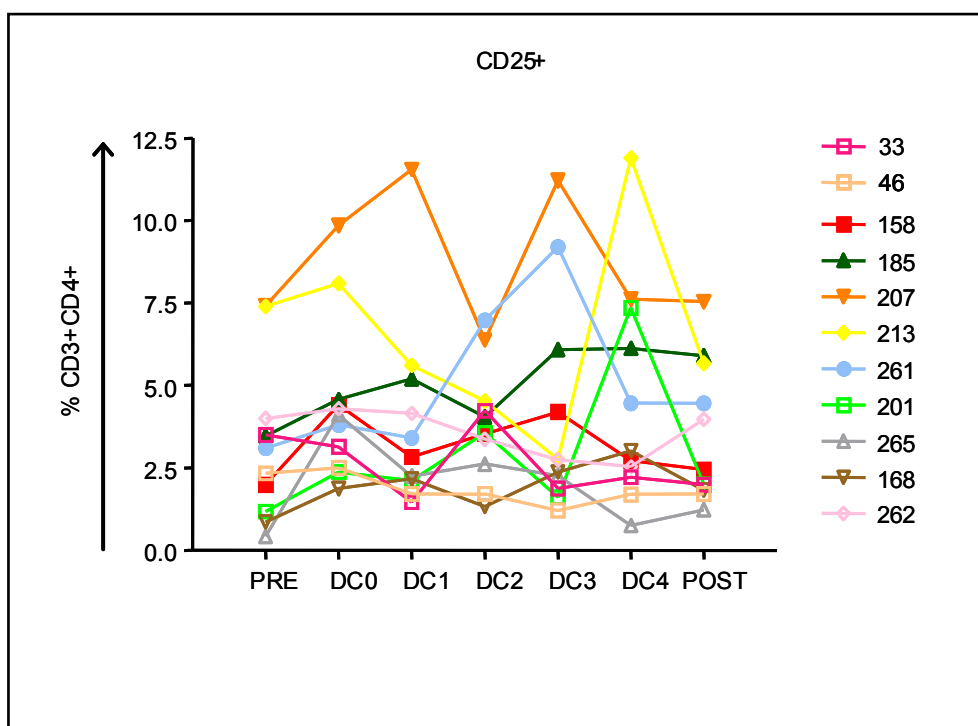
interrompre el TARGA, es va observar una disminució significativa ( $p < 0.05$ ) de les cèl·lules T CD8+ CD45RA+CCR7- (efectores terminals) i un augment, també significatiu ( $p < 0.05$ ) de les cèl·lules T CD8+ CD45RA-CCR7- (memòria efectores).



**Figura 19.** Dinàmica de les cèl·lules T CD8+ CD45RA+CCR7+ (Efectores Terminals) (A) i CD45RA-CCR7- (Memòria Efectores) (B) dels 12 pacients crònics infectats pel VIH-1 que han rebut les successives immunitzacions de la vacuna de cèl·lules dendrítiques.

### 5.2.4.2 Estudi de les cèl·lules T CD4+CD25+

- La freqüència de les cèl·lules T CD4+CD25+ es va mantenir constant al llarg de tot l'estudi. En 3 (#201, #213, #261) dels 11 pacients estudiats es va observar un augment transitori i no estadísticament significatiu d'aquestes cèl·lules. No s'han pogut realitzar l'estudi de les cèl·lules T CD4+CD25+ dels individus control.



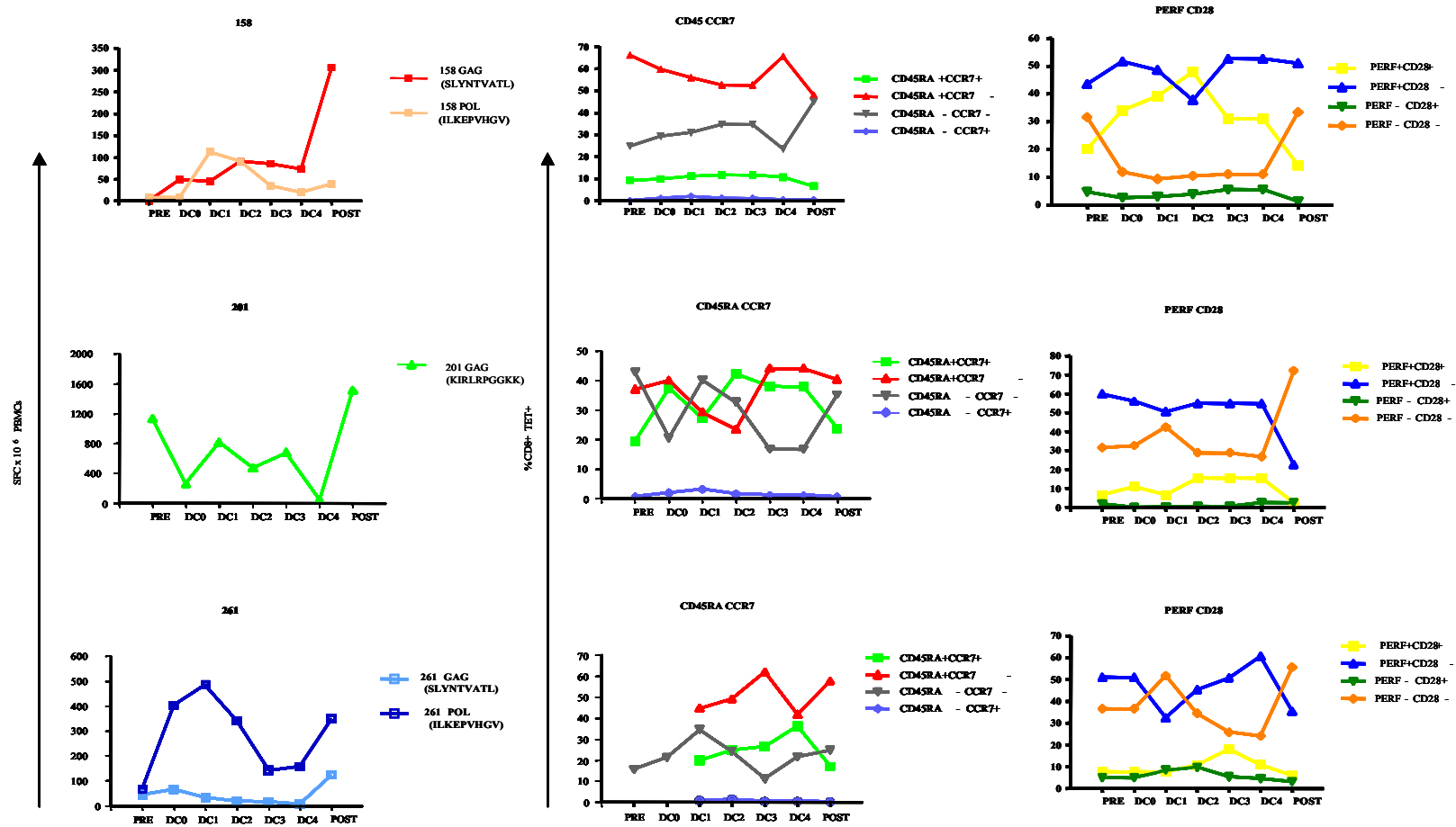
**Figura 20.** Dinàmica de les cèl·lules T CD4+ CD25+ dels 11 pacients crònics infectats pel VIH (no vam disposar de cèl·lules del pacient #269) que van rebre la vacuna de cèl·lules dendrítiques.

### 5.2.4.3 Respostes CD8+ específiques contra el VIH

- Quan es va fer l'estudi més acurat de la resposta de les cèl·lules T CD8+ utilitzant com a pèptids els mateixos epítops que s'havien utilitzat pel marcatge amb tetràmers, es va observar que dos dels pacients (#201, #261) presentaven una marcada disminució de la producció d'IFN- $\gamma$  durant el període de vacunacions, mentre que aquests nivells es recuperaven després de la setmana 30 quan es va interrompre el tractament. El fenotip de



les cèl·lules dels pacients que presentaven aquesta disminució en la producció d'IFN- $\gamma$  va ser diferent al de les cèl·lules dels pacients en els quals no es va observar cap disminució. Les cèl·lules T CD8+ Tet-Gag+ del pacient #201 van presentar un fenotip efector però amb un increment de les cèl·lules T CD8+ memòria central o CD45RA-CCR7+ i el pacient #261 va presentar unes cèl·lules T CD8+ Tet-Pol+ amb un fenotip principalment efector i també una elevada proporció de cèl·lules naïve CD45RA+CCR7+Perforina+ (figura 21)



**Figura 21.** Canvis en la dinàmica de la producció d'IFN- $\gamma$  de les diferents sub poblacions de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> Tet<sup>+</sup> en funció de l'expressió dels marcadors CD45RA, CCR7, CD28 i la producció de perforina de totes les mostres estudiades al llarg de l'estudi. Els tetràmers utilitzats per identificar les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> VIH-1-específiques van ser HLA A\*02 Gag p17 SLYNTVATL and HLA A\*02 Pol ILKEPVHGV pels pacients #158 and #261, i HLA A\*03 Gag p17 KIRLRPGGKK pel pacient #201. Els percentatges de les diferents sub poblacions gatejades per les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> Tet<sup>+</sup> Gag<sup>+</sup> es troben representades a les gràfiques del centre i les de la dreta. Els pèptids utilitzats per estimular les PBMCs en l'assaig de l'ELISPOT corresponen als tetràmers utilitzats per cada pacient. Les cèl·lules formadores d'spots (SFC) per milió de PBMCs es troben representades a les gràfiques de l'esquerra.

### **5.2.5 Efectes de la vacuna terapèutica sobre la seqüència dels epítops immunodominants**

Es va seqüenciar una mostra corresponent al dia 0 abans de qualsevol immunització (mostra PRE) i una mostra corresponent a la setmana 30-40 un cop ja havien rebut totes les vacunacions i quan es va interrompre el tractament (mostra POST). En els controls la mostra PRE correspon a una mostra abans de rebre qualsevol tractament i la mostra POST corresponen a una mostra obtinguda entre la setmana 30 i la 40 un cop parat el TARGA.

#### **5.2.5.1 p17 Gag**

- Epítop TLNAWVKVY restringit per l'HLA-A\*02: no es van trobar canvis d'aminoàcids importants ni en les mostres corresponents als pacients ni a les dels controls.
- Epítop WASRELERF restringit per l'HLA-B\*35: en aquest epítop tampoc es van trobar canvis importants.
- Epítop KIRLRPGGKK restringit per l'HLA-A\*03: es van trobar canvis d'aminoàcids de poca importància, per exemple el canvi d'una Lys (L) per una Arg (R) a la posició 9; aquest canvi es va trobar en únic clon, excepte en els pacients #158 i #265; les mostres pre i post-immunització del pacient #158 van presentar aquesta mutació, en canvi en el cas del pacient #265 van ser la majoria dels clons pre-immunització els que la presentaven. Tots els clons de la mostra post-immunització del pacient #269 seqüenciats, van presentar el canvi d'una Lys (L) per una Ser (S) posició 9.
- Epítop SLYNTVATL restringit per l'HLA A\*02: en aquest epítop es van trobar diverses mutacions, per exemple la majoria de clons (20 de 32) de la mostra pre-immunització del pacient #207 presentava una Ile (I) a la posició 6, mentre que tots els clons de la mostra post-immunització hi tenien una Val (V). A més a més, la majoria dels clons (tant de la mostra pre com de la post) tenien una Phe (F) a la posició 3. En aquest mateix pacient totes els clons seqüenciats (pre i post) tenien

una Val (V) a la posició 8, però la presència d'una Thr (T) a la posició 7 tans sols es va poder observar en 13 dels 19 clons de la mostra post-immunització. En el pacient #261 una lle (l) a la posició 6 i una Val (V) a la posició 8 es van trobar en tots els clons de la mostra pre-immunització. En la mostra post-immunització la majoria de clons tenien la Val (V) de la posició 8 i tan sols 5 dels 13 clons tenien la lle (l) de la posició 6. En 5 dels 13 clons de la mostra post-immunització es van observar dues mutacions: una Ala (A) a la posició 5 i una Leu (L) a la posició 6. El pacient #262 tenia una His (H) a la posició 3 de tots els clons i una lle (l) a la posició 6 de 13 dels 20 clons pre-immunització. La majoria dels clons de la mostra post-immunització tenien una lle (l) a la posició 6 i en 10 dels 23 clons una Val (V) a la posició 8. En 18 dels 18 clons de la mostra pre-immunització del pacient #265 hi havia una Phe (F) a la posició 3, la qual va ser substituïda per una Tyr (Y) en tots els clons de la mostra post-immunització. El canvi de la Phe (F) per la Tyr (Y) en aquest individu, es va donar simultàniament al canvi d'una Thr (T) per una Val (V) a la posició 8. En tots els clons de la mostra pre-immunització de l'individu #269 es va trobar una lle (l) a la posició 6, la qual va ser substituïda per una Tyr (Y) en 17 dels 17 clons de la mostra post-immunització. Cal dir que els canvis que es van trobar entre els individus immunitzats van ser similars als trobats en el grup control; tots els clons de la mostra pre-immunització de la mostra de l'individu control #105 tenien una Phe (F) a la posició 3, mentre que només 3 dels 19 clons de la mostra post-immunització tenien aquesta mutació; els altres 16 dels 19 clons presentaven una lle (l) a la posició 6 i una Val (V) a la posició 8. L'individu control #166 tenia una lle (l) a la posició 6 i una Val (V) a la posició 8 en 10 dels 14 clons de la mostra pre-immunització. En la mostra post-immunització d'aquest individu la majoria de clons (11 de 16) tenien les mateixes mutacions i una Phe (F) a la posició 3. En el control #228, es va trobar una Phe (F) a la posició 3 en 19 dels 20 clons de la mostra pre-immunització, però aquest canvi d'aminoàcid no es va trobar en 15 dels 18 clons de la mostra post-immunització.

A

SUBJ.	SAMPLE	K I R L R P G G K K	%	S L Y N T V A T L	%	T L N A W V K V Y	%	W A S R E L E R F	%
33	PRE	..... R	19/20 1/20	..... I . V	19/20 1/20	.....	20/20	.....	20/20
	POST	.....	19/19	..... I . V	20/20	.....	20/20	.....	20/20
46	PRE	.....	20/20	..... I . V	20/20	.....	20/20	..... *	19/20 1/20
	POST	.....	20/20	..... I . V	19/20 1/20	.....	20/20	.....	20/20
158	PRE	..... R ..... S	11/18 6/18 1/18	..... I . V	16/18 2/18	.....	18/18	.....	18/18
	POST	..... R ..... R	14/19 4/19 1/19	.....	19/19	.....	19/19	..... K . K * . . K . .	17/19 1/19 1/19
168	PRE	.....	18/18	.....	18/18	.....	18/18	.....	18/18
	POST	.....	20/20	.....	20/20	.....	20/20	.....	20/20
185	PRE	..... R	19/20 1/20	.....	20/20	.....	20/20	.....	20/20
	POST	..... R	19/20 1/20	.....	20/20	.....	20/20	..... G . . . .	19/20 1/20
201	PRE	..... R	17/18 1/18	..... I . V	18/18	.....	18/18	.....	18/18
	POST	..... F	17/18 1/18	..... I . V	18/18	.....	18/18	.....	18/18
207	PRE	.....	32/32	..... I . V ..... F . . V ..... F . . V ..... F . A . V	14/32 10/32 6/32 2/32	.....	32/32	.....	32/32
	POST	..... W	18/19 1/19	..... F . . T V ..... F . . V ..... T V	7/19 6/19 6/19	.....	19/19	.....	19/19
213	PRE	..... *	18/19 1/19	..... I . V ..... A . . ..... A . .	15/19 2/19 1/19 1/19	.....	19/19	.....	19/19
	POST	.....	20/20	.....	20/20	.....	20/20	.....	20/20
261	PRE	.....	20/20	..... I . V	20/20	.....	20/20	..... P . . . .	19/20 1/20
	POST	.....	13/13	..... I . V ..... A L . V ..... F . . V ..... A L . .	5/13 4/13 3/13 1/13	.....	13/13	.....	13/13
262	PRE	.....	20/20	..... H . I . . ..... H . . . .	13/20 7/20	.....	20/20	.....	20/20
	POST	..... E	22/23 1/23	..... I . V ..... H . . . . ..... H . I . . ..... I . . . .	10/23 8/23 4/23 1/23	.....	23/23	..... G . . . .	22/23 1/23
265	PRE	..... R	16/18 2/18	..... F . I . . ..... F . . . .	12/18 6/18	.....	18/18	.....	18/18
	POST	.....	17/17	..... I . V	17/17	.....	17/17	..... V . . . .	15/17 2/17
269	PRE	..... R	18/19 1/19	..... I . V	19/19	..... A . . . .	18/19 1/19	.....	19/19
	POST	..... S	16/16	..... V	16/16	.....	16/16	.....	16/16

## B

CONTROL	SAMPLE	K I R L R P G G K K	%	S L Y N T V A T L	%	T L N A W V K V Y	%	W A S R E L E R F	%
105	PRE	. . . . . E	18/20 1/20	. . F . . . . .	20/20	. . . . .	19/19	. . . . .	20/20
	POST	. N S . . . . .	18/19 1/19	. . . . . I . V . .	16/19 3/19	. . . . . S . . . . .	18/19 1/19	. . . . . V . . . . .	16/19 3/19
166	PRE	. . . . .	14/14	. . . . . I . V . .	10/14 4/14	. . . . .	14/14	. . . . .	14/14
	POST	. . . . .	16/16	. . F . . I . V . .	11/16 5/16	. . . . .	16/16	. . . . .	16/16
228	PRE	. . . . . S . . . . .	19/20 1/20	. . F . . . . .	19/20 1/20	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
	POST	. . . . . R . . . . .	17/18 1/18	. . . . . A . . . . .	15/18 1/18	. . . . .	18/18	. . . . .	18/18
282	PRE	. . . . .	15/15	. . F . . . . . V . .	9/15 4/15	. . . . .	15/15	. . . . .	15/15
	POST	. . . . .	19/19	. . . . . I . V . .	19/29 10/29	. . . . .	29/29	. . . . .	29/29
296	PRE	. . . . .	18/18	. . . . . I . V . .	18/18	. . . . .	18/18	. . . . .	18/18
	POST	. . . . .	19/19	. . . . . I . V . .	19/19	. . . . .	19/19	. . . . . V . . . . .	11/19 8/19

**Taula 11.** Anàlisi de la variabilitat de la seqüència gag del virus autòleg. A la taula (A) es mostren les mutacions trobades en els epítops immunodominants del fragment p17 del gen gag dels 12 individus immunitzats, i a la taula (B) trobem les mutacions dels individus del grup control.

### 5.2.5.2 p24 Gag

- Epítop EIYKRWII restringit per l'HLA B\*08: es va trobar una mutació a la posició 1 en el pacient #207; tots els clons tant de la mostra pre com de la mostra post-immunització tenien un Asp (D) a la posició 1. A més a més en la mostra post-immunització es va trobar una Thr (T) a la posició 4 de 10 dels 20 clons analitzats, mentre que tots els clons de la mostra pre-immunització tenien una Lys (K). en el pacient #269 no es va trobar cap mutació en els clons de la mostra pre-immunització, en canvi tots els clons de la mostra post-immunització tenien una Lys (K) a la posició 5 substituint a una Arg (R). En els pacients control no es van trobar mutacions.
- Epítop TSTLQEQIGW restringit per l'HLA B\*57: el pacient #207 presentava dues mutacions presents a tots els clons analitzats (tant els de la mostra pre com els de la post-immunització). Tenien una Asn (N) que substituïa a una Thr (T) a la posició 3, i una Ala (A) que substituïa a una Gly (G) a la posició 9. No es van trobar mutacions en aquest epítop en el grup control.

A

SUBJ.	SAMPLE	E I Y K R W I I	%	T S T L Q E Q I G W	%
33	PRE	. . . . .	18/18	. . . . .	18/18
	POST	. . . . . * . . . .	17/19 2/19	. . . . . * . . . .	14/19 5/19
46	PRE	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
	POST	. . . . .	17/17	. . . . .	17/17
158	PRE	. . . . .	18/20	. . . . .	17/20
		K . . . . .	1/20	. . . . . A .	3/20
		K . . . . . * . . . .	1/20		
	POST	. . . . .	17/20	. . . . .	16/20
		K . . . . .	2/20	. . . . . A .	2/20
		. . . . . K . . . .	1/20	. . . . . * .	2/20
168	PRE	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
	POST	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
185	PRE	. . . . .	17/17	. . . . .	17/17
	POST	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
201	PRE	. . . . .	19/19	. . . . .	19/19
	POST	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
207	PRE	D . . . . .	19/19	. . N . . . . . A .	19/19
	POST	D . . . . .	10/20	. . N . . . . . A .	20/20
		D . . T . . . . .	10/20		
213	PRE	. . . . .	18/18	. . . . .	18/18
	POST	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
261	PRE	. . . . .	19/19	. . . . .	19/19
	POST	. . . . . C . . . .	19/20 1/20	. . . . .	20/20
262	PRE	. . . . .	19/19	. . . . . E .	18/19 1/19
	POST	. . . . . * . . . .	14/18 4/18	. . . . .	18/18
265	PRE	. . . . .	18/18	. . . . .	18/18
	POST	. . . . .	17/17	. . . . . A .	16/17 1/17
269	PRE	. . . . . K . . . .	18/19 1/19	. . . . .	19/19
	POST	. . . . . K . . . .	19/19	. . . . .	19/19



## B

CONTROL	SAMPLE	E I Y K R W I I	%	T S T L Q E Q I G W	%
105	PRE	. . . . .	18/18	. . . . .	18/18
	POST	. . . . .	18/18	. . . . .	18/18
166	PRE	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
	POST	. . . . .	19/19	. . . . . E .	18/19 1/19
228	PRE	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
	POST	. . . . . G . . . .	12/13 1/13	. . . . .	13/13
282	PRE	. . . . . R . . . .	18/20 2/20	. . . . . K . . . .	19/20 1/20
	POST	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20
296	PRE	. . . . .	19/19	. . . . .	19/19
	POST	. . . . .	20/20	. . . . .	20/20

**Taula 12.** anàlisi de la variabilitat de la seqüència gag del virus autòleg. A la taula (A) es mostren les mutacions trobades en els epítops immunodominants del fragment p24 del gen gag dels 12 individus immunitzats, i a la taula (B) trobem les mutacions dels individus del grup control.

A part de totes les mutacions presents en tots els epítops estudiats, es van trobar dues insercions de 5 i 9 aminoàcids en dos dels individus immunitzats. El pacient #262 presentava una inserció de 9 aminoàcids (122-130 aa) en tots els clons de la mostra pre-immunització i només 5 dels 13 clons de la mostra post, presentaven aquesta inserció. En el pacient #269 es va trobar una inserció de 5 aa (119-123) en tots els clons analitzats de la mostra post-immunització.

## A

SUBJECT	SAMPLE	K K K A Q Q A A A D - - - - - T G H S N Q V S Q N	%
262	PRE	aa 112 . . . . . A A G N S S A A A A . . N . S . . . . . aa 132	20/20
	POST	. . . . . A A G N S S A A A A . . N . S . . . . .	8/13 5/13

## B

SUBJECT	SAMPLE	K K K A Q Q A - - - - - A A D T G H S N Q V S Q N	%
269	PRE	aa 112 . . . . . N N S . . . . . aa 132	19/19
	POST	. N R T . . A A Q Q T . . . . .	16/16

**Taula 13.** Inserció de 5 (119-123) i 9 aa (122-130) en el fragment p17 gag dels pacients #262 (A) i #269 (B) respectivament. Les seqüències del fragment Gag es van comparar amb una seqüència consens d'HXB2