

**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

## **6. DISCUSSIÓ**



## 6. DISCUSSIÓ

### 6.1. INTERRUPCIONS ESTRUCTURADES DEL TRACTAMENT

Les interrupcions estructurades del tractament com a estratègia terapèutica s'han estudiat des de l'anecdòtica publicació dels articles de Franco Lori i Douglas Nixon. Com ja ha estat esmentat per diferents autors, les interrupcions estructurades del tractament poden ésser considerades com el mètode més simple de teràpia immunomediada activa (Montaner L, 2001).

L'objectiu principal de les interrupcions estructurades del tractament és, mitjançant la presentació del virus autòleg (autovacunació) en pacients amb TARGA eficaç durant llargs períodes de temps, induir una resposta immunitària amb la capacitat de controlar el virus en absència de tractament, estalviant per tant, medicació i reduint els efectes secundaris. En segon lloc, les interrupcions estructurades del tractament han fet possible l'inici de nous camps d'investigació, especialment el que fa referència al millor coneixement de les relacions existents entre el VIH-1 i el sistema immunitari. Cal comentar també, que les interrupcions estructurades del tractament han estat estudiades tant en pacients primoinfectats com en pacients amb una llarga evolució de la malaltia, i que els resultats obtinguts han estat discordants. En els pacients primoinfectats s'han detectat anticossos neutralitzants VIH-1-específics amb una gran activitat i tant la resposta de les cèl·lules T CD4+ helper com la de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques s'han pogut relacionar amb el control de la virèmia (Rosenberg ES, Nature 2000; Montefiori DC, J Virol 2001). En canvi, els resultats obtinguts, fins al moment, en pacients crònics demostren que, tant la resposta de les cèl·lules T CD4 helper, com la de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques són més dèbils que les obtingudes en els primoinfectats, i que tan sols el 20% dels pacients amb infecció crònica presentaven una reducció significativa del nivell de càrrega viral assolit després de les successives interrupcions estructurades del tractament (García F, AIDS, 2001; Ortiz GM, PNAS USA 2001). També cal destacar que l'augment de la resposta CTL observat després de les interrupcions del tractament, en els pacients amb

infecció crònica, no es pot relacionar de manera clara amb el nivell de càrrega viral assolit després de sotmetre als pacients a l'estratègia que ens ocupa.

Aquests són, bàsicament, els motius que ens van dur a dissenyar un calendari d'interrupcions estructurades del tractament que consistia en 5 cicles d'interrupcions cada un dels quals constava de dues setmanes sense tractament seguides de 8 setmanes amb tractament; després de l'últim cicle tots els pacients es van seguir durant, aproximadament, 2 anys. La cohort escollida estava formada per 45 pacients, les característiques dels quals eren: pacients crònics infectats pel VIH-1 amb un recompte de cèl·lules T CD4 basals  $> 400$  cèl·lules/mm<sup>3</sup> i una CV  $> 5000$  còpies/mL abans de rebre cap tractament antiretroviral. Tots els pacients van rebre TARGA durant com a mínim un any i es van mantenir amb una CV  $< 20$  còpies/mL durant més de 32 setmanes abans de començar el calendari de les interrupcions. Com ja hem esmentat abans, 20 d'aquests pacients 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.

Si ens centrem en els resultats dels nivells de càrrega viral obtinguts abans, durant i després de les interrupcions estructurades del tractament, cal comentar que s'ha observat un rebot de la càrrega viral durant els successius cicles d'interrupcions. Els nivells de càrrega viral assolits durant els primers 4 cicles de les interrupcions han anat disminuint progressivament, però aquestes disminucions no han estat estadísticament significatives. Tot i així és important destacar que després de l'última interrupció del tractament (és a dir durant la interrupció definitiva del tractament), el nivell de càrrega viral ha augmentat considerablement, s'ha estabilitzat i ha assolit l'anomenada càrrega viral d'equilibri o *set point* viral. Aquest *set point* viral ha estat inferior al nivell de la càrrega viral basal abans de qualsevol tractament antiretroviral. Aquests resultats demostren que després de sotmetre els pacients a un calendari d'interrupcions estructurades del tractament, la càrrega viral d'equilibri assolida és inferior a la càrrega viral basal abans de qualsevol tractament,

resultats que corroboren els descrits a la literatura (Ortiz GM, PNAS USA 2001, Oxenius, PNAS USA 2001).

Si analitzem els resultats dels percentatges de cèl·lules T CD4+ obtinguts al llarg de l'estudi cal dir que s'ha observat una disminució des del dia 0 (primer dia del primer cicle) fins a la setmana 52 (12 setmanes després de l'última interrupció del tractament). Aquesta disminució ha estat estadísticament significativa i s'ha observat, principalment, durant les setmanes en les quals els pacients es trobaven sense tractament, en canvi no ha estat així quan els pacients es trobaven sota tractament antiretroviral. La literatura descriu que la velocitat de la disminució en el percentatge de cèl·lules T CD4+ es correlaciona de manera negativa amb la càrrega viral plasmàtica basal, el recompte de limfòcits T CD4+ nadir (el recompte de limfòcits T CD4+ més baix al qual ha arribat el pacient), i de manera positiva amb el recompte de limfòcits T CD4+ en el moment de la interrupció i amb els limfòcits T CD4+ guanyats durant el TARGA (Thiebaut R, AIDS 2005).

En un estudi realitzat pel nostre grup amb una cohort de pacients similar a la que ens ocupa es va descriure: que la resposta limfoproliferativa de les cèl·lules T a lectines mitogèniques i CD3+CD28 es trobava preservada, inclús abans de la teràpia; que la resposta limfoproliferativa de les cèl·lules T CD4+ a l'antigen de record tal com el toxoide tetànic es mantenia al llarg de l'estudi; i que la RLP al CMV es recuperava després d'un any amb tractament antiretroviral. (Plana M, Lancet 1998)

En el treball que ens ocupa, la resposta limfoproliferativa de les cèl·lules T CD4 ha estat analitzada al llarg de l'estudi, tot i que al no disposar de les dades en el moment basal (abans de qualsevol tractament), no s'han pogut comparar els valors assolits després de la interrupció definitiva del tractament amb els valors basals. De totes maneres cal comentar que s'ha observat una disminució de la resposta limfoproliferativa a lectines mitogèniques i a antígens CD3+CD28 i també a citomgalovirus entre el primer dia del primer cicle d'interrupcions i la setmana 52. En canvi, l'índex d'estimulació a antígens de record (en el nostre cas el toxoide tetànic) ha augmentat significativament durant els cicles d'interrupcions del tractament, però després de la interrupció definitiva del tractament ha

anat disminuint. Aquest últim resultat es pot explicar si tenim en compte que l'aparició de la replicació viral durant els períodes curts d'interrupcions estructurades del tractament, comentats anteriorment, pot promoure l'activació dels limfòcits Th, fet que es manifesta amb un increment de la resposta limfoproliferativa de les cèl·lules T als antígens de record, mentre que períodes llargs de replicació viral supprimeixen la funció de les cèl·lules T.

Pel que fa a la resposta limfoproliferativa de les cèl·lules T VIH-1-específiques s'ha observat un augment significatiu de l'índex d'estimulació entre el dia 0 i la setmana 52. Aquest augment ha estat observat principalment durant el segon i quart cicle d'interrupció estructurada del tractament. És important comentar que a partir de la setmana 52 la resposta proliferativa de les cèl·lules CD4+ va ser dèbil i transitòria en tots els pacients. Un fet important a tenir en compte és que la càrrega viral d'equilibri assolida pels pacients es correlaciona de manera negativa amb la resposta limfoproliferativa de les cèl·lules T CD4+, però no amb la resposta de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques (com ja analitzarem posteriorment). De totes maneres, cal recordar que la supressió o anèrgia de les cèl·lules T CD4+ VIH-1-específiques es pot donar també en pacients que mostren pics elevats de virèmia tal i com demostra la literatura (Douek, *Nature*, 2002). A la literatura, trobem també, que l'any 2002 (Blankson, *JAMA*, 2002) es va descriure el cas de dos pacients que presentaven una forta resposta Th VIH-1-específica abans de la interrupció estructurada del tractament, i que aquesta es perdia després del cicle d'interrupcions. Aquestes dades impliquen que nivells elevats de replicació viral poden perjudicar la resposta de les cèl·lules T CD4+ VIH-1-específiques, però no exclou el fet que pacients amb pics baixos de CV podrien augmentar l'efectivitat de les respostes VIH-1-específiques. Les dades obtingudes del treball que ens ocupa, corroboren aquesta última hipòtesi ja que, com hem comentat anteriorment, la resposta VIH-1 específica es detecta durant el segon i quart cicle de STI, períodes en els quals la CV rebot a nivells similars als obtinguts en els altres cicles. És important dir que la resposta de les cèl·lules Th s'aprecia i es veu augmentada tant durant els períodes amb, com durant els períodes sense TARGA, i que desapareix després de l'última interrupció del TARGA, moment en el qual la CV es manté elevada

durant períodes llargs. Aleshores podem dir que l'absència de resposta proliferativa de les cèl·lules T CD4+ *in vitro* en pacients amb viremia detectable podria ser un efecte, però no necessàriament una causa del desenvolupament de la replicació. Tot i així, és possible que aquesta disminució de la resposta proliferativa *in vitro* durant la viremia sigui el reflex d'unes funcions *in vivo* detriorades. Existeix una concordança entre el fet que les cèl·lules T CD4+ VIH-específiques persisteixin en pacients amb infecció avançada i un augment de la CV, tot i que la capacitat d'aquestes cèl·lules de proliferar *in vitro* estigui mermada. En aquest sentit, s'han publicat dades que demostren que les cèl·lules T CD4+ VIH-específiques de pacients amb una CV detectable no són, simplement, suprimides pel virus, sino que a més a més són deficientes en la seva capacitat de produir IL-2 i per tant de proliferar (Younes, JexpMed, 2003). Podriem arribar a pensar que això és el que es produeix en els nostres pacients, que no controlen la replicació viral. Respecte a la funcionalitat dels limfòcits T CD4 específics és ben coneguda l'absència de resposta proliferativa en la infecció progressiva pel VIH malgrat la presència de cèl·lules T CD4 específiques anti-VIH secretores d'IFN- $\gamma$  (Plana M, Lancet, 1998; Iyasere, Jvirol, 2003; Harari A, Blood, 2004). Aquesta aparent discrepància ha pogut ser entesa en estudis posteriors, en identificar-se tres tipus de poblacions amb diferències funcionals: cèl·lules secretores de IL-2, cèl·lules secretores d'IFN- $\gamma$ , i cèl·lules secretores d'ambdues citocines. En els individus amb infecció progressiva, comparats amb els no-progressors, s'ha observat una manca de cèl·lules secretores de IL-2 (Harari, Jimmunol, 2005; Harari A, Blood, 2004), i també s'ha trobat en pacients tractats virèmics comparats amb avirèmics (Harari, Jimmunol, 2005). Així la manca de resposta proliferativa està associada amb la manca de poblacions de CD4 secretores d'IL-2, i s'ha demostrat una correlació directa entre la resposta proliferativa i la producció d'IL-2 però no amb la secreció d'IFN- $\gamma$  (Harari A, Blood, 2004), i entre la producció d'IL-2 i la virèmia (Harari A, Blood, 2004; Norris Jvirol, 2004).

Si parlem ara de les cèl·lules T CD8+, el primer que cal comentar és que el percentatge d'aquestes cèl·lules des del dia 0 fins a la setmana 52 ha augmentat



significativament, a diferència del que succeeix amb les cèl·lules T CD4+. Aquest increment s'ha observat tant durant les interrupcions estructurades del tractament com després de la interrupció definitiva del mateix. Cal dir també, que el percentatge de cèl·lules T CD8+ assolit és similar a l'obtingut en el moment basal. L'anàlisi de la resposta CTL des del dia 0 fins a la setmana 52 mostra un augment significatiu de la magnitud de la resposta. A diferència del que passa amb la càrrega viral (que es comença a estabilitzar a partir de la setmana 52), la resposta de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques va augmentant fins al final del seguiment dels pacients i no sembla que tendeixi a estabilitzar-se. Aquest increment s'ha observat, principalment, després de la interrupció definitiva del tractament. A la literatura trobem treballs (Oxenius, PNAS USA, 2002; García F, AIDS, 2003) que demostren, al igual que nosaltres, que després de la interrupció definitiva del tractament la resposta CTL és induïda de manera important, però que tot i així és incapaç de controlar la replicació viral. Per intentar donar una explicació a aquest fenomen, podem dir per exemple, que la manca de funcionalitat de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques podria ser deguda a que es troben en un estat pre-terminal i per tant no tenen capacitat de produir perforina. Els autors atribueixen aquest fet a la manca de la resposta específica Th, i per tant a la incapacitat d'aquestes d'estimular a les cèl·lules T CD8+ correctament (D'Offizi, AIDS, 2002). Una altra possible explicació que fa referència als resultats obtinguts de la resposta CTL podria ser el fet que els pacients primoinfectats, a diferència dels pacients durant la fase crònica de la infecció, on sembla que no es produeix una inducció de la resposta de les cèl·lules T CD8 específiques, presenten una resposta CTL nova i qualitativament diferent després de les interrupcions del tractament (Yu XG, Jvirol, 2002). De fet, l'augment de les respostes CTL durant els cicles d'STI podrien ser degudes, en gran part, a un restabliment de la resposta de les cèl·lules T CD8+ que ja existeix abans d'iniciar el TARGA, o bé a l'expansió de les respostes preexistents del teixit limfàtic (Altfeld M, Jclin Invest 2002).

L'augment i manteniment de la resposta T helper, juntament amb l'augment de la resposta CTL són unes de les qüestions més importants per aconseguir un control

immune després de les interrupcions estructurades del tractament. Aquest concepte està d'acord amb les dades aportades en un model murí de la infecció que demostra que la qualitat de la resposta de les cèl·lules T CD8+ memòria depèn de les cèl·lules T CD4 helper (Shedlock, Science, 2003 ; Sun JC, Science, 2003).

Al plantejar-nos aquest treball ens va semblar molt interessant estudiar, també, altres paràmetres del sistema immunològic tals com els canvis en les cèl·lules T naïve i memòria i la dinàmica dels marcadors de maduració i activació de les cèl·lules T.

Els resultats obtinguts han demostrat en primer lloc, un increment en el percentatge de cèl·lules T CD8+CD28+ durant el període amb TARGA abans de sotmetre els pacients al calendari d'interrupcions estructurades del tractament. No obstant, durant els successius cicles d'interrupcions s'ha observat que aquest percentatge ha anat augmentant, per acabar disminuint significativament un cop s'arriba a la interrupció definitiva del tractament. Cal destacar que l'expressió de CD28 no s'estabilitza i que va disminuint fins al final del seguiment dels pacients. Hem de remarcar que tot i aquesta disminució, el percentatge de cèl·lules T CD8+CD28+ es manté significativament per sobre del percentatge basal. El percentatge de cèl·lules T CD8+CD28-CD57+ no ha variat al llarg de l'estudi, com tampoc s'han observat canvis significatius en el percentatge de cèl·lules T CD4+CD28+. L'absència de l'antigen de superfície CD28, juntament amb una manca de la resposta limfoproliferativa en condicions de cultiu, ens podria dur a la conclusió que ens trobem davant d'una subpoblació en un estat de maduració més tardà, com a resultat de l'estimulació antigènica repetida i a un augment del nombre de cicles de divisió de les cèl·lules. La disminució de les cèl·lules T CD8+ CD28+ s'ha observat també, en pacients que es troben en una etapa primerenca de la infecció pel VIH-1 (Plana M, AIDS, 2000), fet que indica un deteriorament de la funció immunològica. La presència d'una petita subpoblació de cèl·lules T CD8+ senescents al llarg de l'estudi podria indicar la presència d'una petita resposta antiviral.

Cal dir també, que tot i que l'augment de la càrrega viral observat després de cada interrupció del tractament, durant els cicles d'interrupcions estructurades del tractament,

és significatiu, això no s'ha pogut correlacionar amb un increment significatiu dels marcadors d'activació. Tot i així és important dir que després de la interrupció definitiva del tractament el percentatge de cèl·lules T CD8+CD38+ ha augmentat a un ritme constant fins al final del seguiment dels pacients.

S'ha observat que les cèl·lules T CD4 memòria (CD45RA-CD45RO+) disminueixen tant durant els cicles curts de STI com durant les 12 setmanes després de la interrupció definitiva del tractament. Aquests canvis reflecteixen els observats en la reconstitució immune de les cèl·lules T després de l'inici del tractament, on el ràpid augment de les cèl·lules T CD4+ perifèriques és principalment degut a l'alliberació de les cèl·lules T CD4+ memòria que es trobaven segrestades en el teixit limfàtic (Autran B, Science, 1997). Es per aquest motiu, que la disminució de les cèl·lules T CD4 memòria durant les interrupcions estructurades del tractament, podrien suggerir una migració de les cèl·lules cap als nòduls limfàtics on la replicació viral és més activa. Aquesta migració podria ser també l'explicació de l'augment de les cèl·lules T CD4+ naïve observat durant els cicles de STI. Aquest últim increment podria ser degut a l'expansió perifèrica de les cèl·lules T CD4 naïve o bé a l'augment de la producció per part del timus. Una altra possible explicació a l'augment de les cèl·lules CD4+CD45RA+ és que l'exposició viral limitada podria induir a les cèl·lules T CD4 efectores.

Observant els resultats obtinguts podem dir que les exposicions limitades i moderades al VIH, que es donen durant els cicles curts de STI, provoquen un augment de les cèl·lules T CD8+, especialment de les cèl·lules memòria activades, i per tant una disminució de les cèl·lules T CD8+ naïve. Aquest patró també es va mantenir tant durant les 12 setmanes després de la interrupció definitiva del tractament com durant el període en el qual la CV va assolir el seu plateau. Els resultats d'aquest treball coincideixen amb els exposats per Papasavva i col. (Papasavva E, CROI, 2003) que van observar, a les 4 setmanes de la interrupció del tractament, un augment significatiu de la freqüència de cèl·lules CD3+HLADR+ i CD8+ memòria i activades (CD8+CD45RO+CD45RA-, CD8+HLADR+) i un descens significatiu de les cèl·lules naïve i amb expressió de CD28

(CD8+CD62L+/CD45RA+, CD8+CD28+). En el treball que ens ocupa, l'augment de la subpoblació de les cèl·lules T CD8+CD28+ durant els cicles curts d'interrupcions estructurades del tractament, pot reflectir la presència de cèl·lules T CD8+ efectores o memòria central.

En aquest treball s'ha estudiat també l'expressió dels coreceptors CCR5 i CXCR4 tant en la superfície de les cèl·lules T CD4 com CD8. S'observa una disminució de l'expressió de les cèl·lules T CD8+ tant durant els cicles de STI com durant la interrupció definitiva del tractament. Kobayashi i col. (Kobayashi, Eur J Immunol, 2004) van descriure que CXCR4 s'expressa principalment en cèl·lules T CD8+ naïve o memòria central (CD27+CD28+CD45RA+) i es down-regula durant la diferenciació d'aquestes cèl·lules cap a fenotip efector.

El nostre grup va descriure que en pacients asimptomàtics en estadis primerencs de la infecció, de la mateixa cohort, tant les cèl·lules T CD4+ com les CD8+ presenten una resposta amb un perfil clarament Th1 abans de qualsevol tractament antiretroviral (Plana M, AIDS, 2000), fet que posa de manifest l'existència d'un augment de la resposta citotòxica contra la infecció viral. Actualment es pensa que exposicions elevades i llargues a l'antigen antiviral condueix a la maduració de les cèl·lules T CD8 cap a diferents estadis per tal d'intentar induir respostes de les cèl·lules T VIH-específiques efectives.

L'estudi de l'expressió dels coreceptors CCR5 i CXCR4 en les cèl·lules T va demostrar que l'augment de l'expressió de CCR5, tant en les cèl·lules T CD4 com CD8, observat en els pacients després de la interrupció del TARGA, juntament amb l'augment de CXCR4 en les cèl·lules T CD4, pot ser degut als canvis en els nivells de citocines del medi, ja que es veuen influenciats pel grau de replicació viral. Les citocines proinflamàtores (TNF- $\alpha$  i IL-12) i les de tipus 1 (IFN- $\gamma$  i IL-2) up-regulen significativament l'expressió de CCR5, i les citocines de tipus 2 (IL-10) down-regula l'expressió d'aquest coreceptor. Aquests tres tipus de citocines, en canvi, augmenten l'expressió de CXCR4 tant en les cèl·lules T CD4 com CD8 (Patterson BK, Clin Immunol 1999). Probablement la

reexposició a l'antigen augmenta la producció de citocines de tipus 1, juntament a l'estímul de la resposta VIH-específica i a un cert grau d'activació cel·lular.

En resum, podem dir que les interrupcions estructurades del tractament han provocat que la càrrega viral d'equilibri assolida per la nostra cohort de pacients sigui inferior a la càrrega viral basal abans de qualsevol tractament. També cal destacar que aquest tipus de teràpia immunomediada ha provocat una disminució de la resposta limfoproliferativa a estímuls mitogènics i a CMV, i un augment, durant els successius cicles d'STI, de l'índex d'estimulació a l'antigen de record toxoide tetànic i a l'antigen p24 del VIH-1. Les nostres dades també indiquen que els canvis en les diferents poblacions de cèl·lules T i la resposta d'aquestes, depen del període de la interrupció de la teràpia en la qual ens trobem, degut a les fluctuacions de la càrrega antigènica.

## 6.2. VACUNES TERAPÈUTIQUES

Com ja hem comentat anteriorment, existeixen moltes dades que constitueixen el fonament de la necessitat d'intentar combinar el TARGA amb mètodes d'immunoteràpia activa eficients, per tal d'induir una resposta anti-VIH-1 eficaç de les cèl·lules Th i CTL. Es creu que seria una bona estratègia per poder aconseguir un control immune de la replicació viral en absència del tractament. En aquest sentit, els coneixements actuals indiquen que l'ús de cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits *ex vivo* com adjuvant natural o fisiològic d'antígens del VIH-1 seria la immunoteràpia activa més potent que pot actualment intentar-se (Banchereau J, Nature 1998).

És per aquest motiu pel qual el nostre grup va dur a terme el primer assaig amb vacunes de cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits amb virus autòleg inactivat per calor en 12 pacients amb infecció crònica pel VIH-1 en tractament antiretroviral des de fases primerenques de la infecció. Cada vacuna pulsada contenia  $2 \times 10^6$  CD pulsades amb 5 virions per cèl·lula en la primera immunització i 3 virions/CD en les posteriors vacunacions. La tolerància a la vacuna va ser bona. No es varen observar reaccions locals, i només en 2 dels 12 pacients es varen produir quadres pseudogripals 24 hores després d'alguna de les immunitzacions. Els resultats demostren que després d'aquesta intervenció la càrrega viral plasmàtica ha disminuït en 0,5 o més log en 4 dels 12 individus immunitzats (30%), mentre que no s'ha observat cap canvi en el grup control. D'altra banda, i gràcies a uns resultats obtinguts en col·laboració amb el Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona, també s'ha observat una disminució de la càrrega viral a nivell del teixit limfàtic, on aquesta disminució ha estat de 0.59 log entre la setmana 0 i la setmana 30. També s'ha comparat la dinàmica en el rebot de la CV en els dos períodes d'interrupció del tractament, i s'ha observat un enlentiment del temps de duplicació de la càrrega viral plasmàtica en el grup vacunat després de les immunitzacions (STOP2), i una disminució significativa de l'àrea sota la corba i de la xifra màxima de càrrega viral plasmàtica en la segona interrupció, també en el grup vacunat,

mentre que no s'han observat diferències en aquests paràmetres en la primera i segona interrupció del tractament en el grup control.

Cal comentar també que s'ha observat una disminució progressiva després de cada immunització tant de la magnitud com de l'amplitud de la resposta CD8+; així, si la mitjana de SFCs ("Spot Forming Cells") a la setmana 0 va ser de 1347 cèl·lules, a la setmana 30 havia disminuït a 504 cèl·lules. L'amplitud de la resposta, definida com el nombre de pèptids reconeguts per cada pacient, va disminuir des d'una mitjana de 6 pèptids a la setmana 0 fins a una mitjana de 2 pèptids a la setmana 30. La resposta de les cèl·lules CD8+ es va anar recuperant progressivament després de l'STOP2 del tractament, i no es va observar cap canvi en la seva magnitud o amplitud en el grup control. A nivell del teixit limfàtic s'ha observat un increment significatiu de la resposta CTL, mesurada per la producció de granzyme, de l'àrea intrafol·licular entre la setmana 0 i la setmana 30, directament correlacionat amb el temps de duplicació de la càrrega viral plasmàtica entre el primer i el segon STOP del tractament.

En el cas de la resposta CD4, s'ha observat un petit increment de la resposta proliferativa a l'antigen p24 després de les dues primeres immunitzacions. Els individus responedors (pacient que va presentar un set point de la CV de com a mínim 0.5 log per sota de la CV basal) han mostrat un increment dèbil però significatiu d'aquesta resposta durant la sèrie d'immunitzacions, si ho comparem amb els individus no responedors (pacients que no van presentar cap canvi en el seu set point viral), i aquest increment s'ha pogut correlacionar de manera directa amb la quantitat de VIH obtingut durant la plasmafèresi, i utilitzat per a pulsar les CD. Pel que fa a la resposta humoral, dir que no se n'ha detectat.

És interessant plantejar-se quina és la millor font d'antigen per a ser utilitzada per a una vacuna. La literatura descriu, per exemple, que l'ús del virus complert inactivat induïx una resposta més potent que els pèptids virals (Ide F, J Med Virol, 2006), utilitzant en ambdós casos CD com adjuvant. En el cas concret del VIH inactivat amb AT-2 (aldrithiol-2; 2,2'-dithiodipiridina), s'ha demostrat que aquest entra a la CD mitjançant un receptor,

mentre que les proteïnes virals recombinants es transportarien cap a l'interior de la cèl·lula mitjançant mecanismes no específics, com l'endocitosi, amb la qual cosa és possible que s'induís, preferencialment, resposta humoral ja que la via de processament de l'antigen en ambdós casos seria diferent.

Revisant la literatura trobem que l'any 2003 un grup francès va publicar els resultats de l'ús d'una vacuna de CD en el model animal per SIV (SIVmac251) (Lu W, Nat Med, 2003) i d'altres autors en un model de vacuna preventiva en ratolins (Lapenta C, J Exp Med, 2003; Yoshida A, J Virol, 2003). En la majoria dels animals inoculats en el model en el qual es va utilitzar SIV es va produir una disminució significativa de la CVP (3 logaritmes) fet que es va correlacionar amb un increment de la resposta cel·lular i humoral específica. D'altra banda, el mateix grup francès ha publicat, recentment, una experiència similar a la que ens ocupa (Lu W, Nat Med, 2004), en la qual es va vacunar amb CD autòlogues pulsades amb virus autòleg a 18 pacients crònics infectats pel VIH-1. Els resultats d'aquest treball demostren una eficàcia similar a la nostra durant les 12 primeres setmanes després de la vacunació (una baixada de la CV d'aproximadament 0,7 log), però es va observar una duració més llarga de la resposta en un 60% dels pacients, mantenint una disminució significativa de la CV després d'un any de les immunitzacions (que en un 50% dels casos va ser d'un logaritme). Aquesta eficàcia virològica es va correlacionar de manera significativa amb un increment de la resposta cel·lular específica que, com a mínim en el cas de la resposta CD4, es va mantenir durant un any. Les diferències d'eficàcia entre el grup francès en humans i el nostre estudi pilot són importants, de totes maneres hem de considerar les diferències metodològiques existents entre aquests dos treballs. En el cas del treball de Lu et al, els virus eren obtinguts per cultiu viral, fet que permetia obtenir una quantitat de virus molt superior a la obtinguda per plasmafèresi, mètode utilitzat en el nostre estudi. Tant la dosi de virus com la dosi de CD utilitzades en les immunitzacions van ser diferents en els dos treballs: el grup francès va utilitzar una dosi de virus 1000 vegades superior a la utilitzada en el nostre estudi pilot, i una dosi de CD de  $10^7$  quan la nostra va ser de  $10^6$ . El nombre de CD pot influir en el nombre que



emigren cap al gangli. En models en càncer s'ha observat que quan el nombre de CD és més elevat, augmenta el nombre de cèl·lules que migren cap a ganglis limfàtics. També el mètode d'inactivació del virus va ser diferent en els dos treballs: el virus del treball del grup francès va ser inactivat amb una substància química AT-2 (aldrithiol-2), que deixa intactes les glicoproteïnes de l'envolta, mentre que en el nostre treball els virus eren inactivats per calor. Els dos treballs presentaven diferències importants en quant al perfil dels individus inclosos, ja que en el treball del grup francès cap d'ells portava TARGA. Una diferència important va ser també l'interval entre vacunacions; en el nostre cas va ser de 6 setmanes, possiblement un temps massa llarg doncs és possible que la detecció de la resposta immune es donés durant la fase de contracció fet que explicaria la dèbil resposta detectada.

Un cop obtinguts els resultats d'aquesta estudi pilot amb la vacuna de cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits i desconeixent encara els mecanismes exactes involucrats en la disfunció de les cèl·lules T CD4 i CD8 en la infecció crònica pel VIH-1 ens va semblar de vital importància estudiar, més acuradament, les característiques fenotípiques i funcionals d'aquestes cèl·lules, en els individus sotmesos a aquesta intervenció terapèutica. El primer que cal comentar, però, és que la disminució de la resposta de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques observada durant el calendari d'immunitzacions ja es troba descrita a la literatura, concretament en un estudi d'immunitzacions amb pèptids restringits per HLA de classe I i II en pacients amb melanoma metastàtic (Phan G, J Immunothera, 2003). Phan et al. tenien la hipòtesi de que la vacunació amb pèptids de melanoma restringits tant per l'HLA-I com l'HLA-II conjuntament podria generar l'activació de les cèl·lules T CD8+ i T CD4+; però això no va ser així, sembla ser que l'addició dels pèptids restringits per l'HLA de classe II provoquen la disminució de la immunitat contra els pèptids restringits per l'HLA-I.

Cal destacar que hem estat capaços de detectar, en un 60% dels pacients, cèl·lules T CD8+ específiques: dos dels pacients presentaven cèl·lules T CD8+ Tet Gag+, dos eren Tet Pol+ i els altres 2 eren tant Tet Gag+ com Tet pol+. D'aquests 6 pacients, 4

van mantenir les freqüències al llarg de les immunitzacions, i les dels altres dos van augmentar després de la setmana 30 quan es va interrompre el tractament. Aquests resultats per tant, ens permeten afirmar que la disminució de la resposta de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específica no va ser deguda a un augment de l'apoptosi de les cèl·lules T CD8+ activades. De totes maneres, actualment se sap que no totes les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques produeixen la mateixa quantitat de citocines (Williams M.A, *Annu. Rev. Immunol*, 2007).

També vam determinar la freqüència de les cèl·lules T CD8+ Tet CMV+, en tots els pacients i controls de l'estudi. Els resultats demostren que 4 dels 10 pacients estudiats i tots els controls presentaven cèl·lules T CD8+ CMV+ ; les freqüències d'aquestes cèl·lules es van mantenir constants al llarg de les immunitzacions. La literatura descriu que quan es para el TARGA, el virus rebrota ràpidament, fet que provoca un augment de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques (Appay, *J. Exp. Med*, 2000; Trabattoni, *AIDS*, 2004), mentre que la freqüència de les cèl·lules T CD8+ CMV-específiques es manté quasi constant al llarg de l'estudi.

Una altra possible explicació a la manca de funcionalitat de les cèl·lules T CD8+ específiques podria ser l'alteració en l'estat de maduració d'aquestes cèl·lules (Gamberg J, *AIDS*, 2004; Wherry, *J Virol*, 2004). Els resultats del treball que ens ocupa, demostren que després de la interrupció del TARGA les cèl·lules efectores terminals (CD8+ CD45RA+ CCR7-) disminueixen significativament, mentre que les cèl·lules memòria efectores (CD8+ CD45RA- CCR7-) augmenten també de manera significativa. Pel que fa a les cèl·lules Tet Gag+ i/o Tet Pol+ dir que són majoritàriament memòria efectores (CD45RA- CCR7-) o efectores terminals (CD45RA+ CCR7-) i CD28-, per tant cèl·lules en un estat de maduració avançat (Appay V, *Nat Med*, 2002). Actualment se sap que l'èxit de les vacunes terapèutiques passa per una major proporció de cèl·lules amb fenotip memòria central, i que el bon control de la virèmia del VIH es relaciona amb la presència de cèl·lules T CD8+ memòria efectores (T<sub>EMRA</sub>) (Northfield JW, *J Virol*, 2007; Vaccari M, *J Immunol*, 2005).

Gran part de les cèl·lules T CD8 va ser capaç de produir perforina, però va mostrar certs problemes en la producció d'IFN- $\gamma$  antiviral. Es va observar una disminució de la producció d'IFN- $\gamma$  durant les successives immunitzacions amb la vacuna de CD. Un cop es va realitzar l'estudi més acurat (utilitzat els mateixos pèptids que s'havien usat per realitzar l'estudi del fenotip amb tetràmers) del perquè d'aquesta disminució, es va observar que 2 dels pacients estudiats presentàven aquesta disminució durant les immunitzacions i que els nivells es van recuperar després de la setmana 30. Un cop obtinguts aquests resultats vam analitzar el fenotip d'aquestes cèl·lules, observant que eren principalment efectores (CD45RA-CCR7+), a diferència de les cèl·lules dels pacients que no van mostrar aquesta disminució en la producció d'IFN- $\gamma$ , les quals tenien un fenotip naïve (CD45RA+ CCR7+). La literatura descriu que com més immadura és una cèl·lula menys capacitat té de produir citocines (Wherry EJ, Jvirol, 2004). Tot i que nosaltres tan sols hem detectat cèl·lules menys madures contra dos epítops immunodominants diferents, podriem hipotitzar que l'efecte global de la disminució de la resposta de les cèl·lules T CD8+ podria ser probablement degut a l'alteració en l'estat de maduració de les cèl·lules T CD8+ VIH-específiques o al fet que diferents epítops podrien suscitar respostes memòria diferents com s'ha suggerit anteriorment (Addo MM, PLOS One, 2007; McKinnon LR, J Immunol, 2007).

Les raons per aquesta disminució de l'activitat de les cèl·lules CD8 circulants són poc clares, però donades les troballes concomitants en el teixit limfàtic (com hem esmentat anteriorment), es podria especular que les cèl·lules específiques sensibilitzades podrien estar-se mobilitzant cap als òrgans limfoides secundaris, on estarien exercint la seva funció.

Una altra possible explicació per entendre la disminució de la producció d'IFN- $\gamma$  es podria atribuir al fenomen de la tolerància transitòria perifèrica que haurien pogut induir les immunitzacions repetides amb la vacuna de CD; les cèl·lules T reguladores serien capaces de suprimir les funcions efectores de les cèl·lules T CD8+ VIH-específiques com ja ha estat descrit prèviament en d'altres intervencions terapèutiques (Kinter AL, JexpMed, 2004;

Phan GK, J Immunotherapy, 2003; Dhodapkar MV, Blood, 2002). Per falta de cèl·lules, no es van poder estudiar acuradament les cèl·lules T reguladores però els nostres resultats no semblen recolzar aquest argument doncs vàrem trobar uns nivells relativament constants i de les cèl·lules T CD4+CD25+ al llarg de l'estudi. A causa de la falta de cèl·lules, tampoc vàrem poder diferenciar entre cèl·lules T reguladores i cèl·lules activades mitjançant els marcadors fenotípics corresponents.

Actualment s'ha demostrat que la sobreexpressió del receptor inhibitori PD-1 es troba associada a una disminució de la producció de les citokines antivirals i depèn tant de l'estat d'activació com del de diferenciació de les cèl·lules T CD8+ (Petrovas C, J Exp Med, 2006; Goldberg MV, Blood, 2007; Sauce D, AIDS, 2007). Tot i que nosaltres no hem pogut determinar la dinàmica d'expressió del receptor de PD-1 durant el nostre estudi, sembla raonable excloure aquesta possibilitat degut al fet que la resposta de les cèl·lules T CD8+ mesurada per la producció d'IFN- $\gamma$  en ocasions augmenta i és capaç de recuperar-se fins assolir els nivells obtinguts abans d'iniciar el calendari de vacunació terapèutica quan es va interrompre el TARGA i la viremia va rebotar.

En paral·lel també hem estudiat la possibilitat de que alguna mutació a nivell dels epítops immunodominants restringits per l'HLA, provocada per la pressió immunològica exercida per la vacuna terapèutica de CD, pogués portar a una disminució de la unió a la molècula d'HLA de classe I o al no reconeixament per part del TCR, fet que provocaria una pèrdua en la funció de les cèl·lules T CD8+ VIH-específiques. Els canvis d'aminoàcids que hem trobat han estat canvis que, o bé no poden ser els causants d'un escapament viral, o bé ja han estat descrits com és per exemple el canvi d'una Thr per una Phe a la posició 3 de l'epítop restringit per l'HLA A\*02 Gag p17 SLYNTVATL. Aquest canvi ha estat àmpliament descrit, i es tracta d'una mutació molt prevalent i que s'associa a una disminució dels nivells de cèl·lules T CD8+ Tet+ tot i que la producció d'IFN- $\gamma$  no es veu massa alterada (Jamieson BD, J Immunol, 2003; López M, AIDS Res Hum Retroviruses 2006). ). En aquest sentit, un dels nostres pacients immunitzats així com els pacients

control que presenten la mutació de Tyr per Phe en aquest epítop, no se'ls hi han detectat cèl·lules T CD8+ que reconeguessin aquest pèptid.

Un fet interessant ha estat la troballa de dues insercions de 6 i 9 aminoàcids a la regió p17 de gag. El pacient que presenta la inserció de 6 aa la presenta tant a la mostra pre com a la mostra post-vacunació; en canvi el pacient que presenta la inserció de 9 aa, tan sols la presenta a la mostra postvacunació. No sabem del cert si aquestes insercions podrien o no alterar la conformació de Gag, però el que sí sabem és que hem estat capaços de detectar cèl·lules T CD8+ Tet+ en el pacient que presenta la inserció abans i després de la nostra intervenció terapèutica, però no en el pacient que tan sols presenta la inserció després de la vacunació, fet que ens suggereix que potser si que s'ha produït alguna alteració en el reconeixement de l'epítop, tot i així es necessiten més estudis per tal de poder confirmar aquesta possibilitat.

Donada l'eficàcia parcial del protocol DCV1 el nostre grup ha posat en marxa un nou assaig clínic titulat "Estudi fase II d'ús de CD mieloides autòlogues com adjuvant cel·lular per a una vacuna terapèutica contra el VIH-1 en pacients en fases primerenques de la infecció pel VIH-1 (protocol DCV2)". Es tracta d'un estudi randomitzat obert amb 60 pacients infectats pel VIH-1 amb una xifra nadir de limfòcits T CD4+ > 350 cèl·lules x10<sup>6</sup>/L, i una CV basal abans de començar qualsevol tractament antiretroviral > 10000 còpies/mL. L'estudi es realitzarà en dues parts: (a) pacients sense tractament antiretroviral que seran randomitzats a rebre 3 vacunacions a intervals de dues setmanes amb cèl·lules dendrítiques pulsades amb virus autòleg; o 3 vacunacions a intervals de dues setmanes amb cèl·lules dendrítiques sense pulsar (serà el grup control); (b) pacients amb tractament antiretroviral amb CV indetectable durant els darrers 6 mesos que seran randomitzats a rebre 3 vacunacions a intervals de dues setmanes amb cèl·lules dendrítiques pulsades amb virus autòleg, seguit d'un període d'interrupció del tractament antiretroviral; un altre grup rebrà 3 vacunacions a intervals de 2 setmanes amb CD pulsades amb virus autòleg, després de rebre les vacunacions es parará el tractament i coincidint amb la parada del tractament es realitzaran 3 noves vacunacions a intervals de 2 setmanes; l'últim grup

rebrà 3 vacunacions a intervals de 2 setmanes amb CD sense pulsar, després rebrà les vacunacions, es parará el TARGA i no rebran més vacunacions (serà el grup control). La realització d'aquest estudi clínic ajudarà a respondre preguntes que encara queden per resoldre, i segur que en plantejarà de noves.

En resum, la vacuna de cèl·lules dendrítiques pulsades amb virus autòleg inactivat per calor ha estat viable, segura i ben tolerada. La resposta immune cel·lular contra el VIH després de l'administració de la vacuna ha estat dèbil i transitoria, però tot i així ha permès un control parcial de la replicació viral. La disminució de la producció d'IFN- $\gamma$  durant les successives immunitzacions pot ser degut a la gran heterogeneïtat de l'estat maduratiu de les cèl·lules T CD8+ VIH-1-específiques. De totes maneres es necessitarien més estudis per saber si això és degut a una disfunció d'aquestes cèl·lules o bé a una migració cap al teixit limfoide com a conseqüència de la nostra intervenció terapèutica.