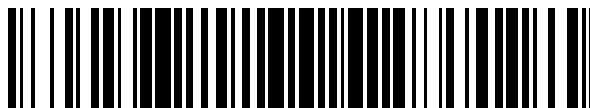


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 915**

21 Número de solicitud: 201490028

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

C07K 4/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

12.09.2012

30 Prioridad:

12.09.2011 US 61/533,476

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.09.2014

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

02.01.2015

Fecha de la concesión:

10.09.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.09.2015

73 Titular/es:

LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. (33.3%)
Avda. Mare de Déu de Montserrat, 221
08041 BARCELONA (Barcelona) ES;
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE
LA SIDA - CAIXA (33.3%) y
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (33.3%)

72 Inventor/es:

BRANDER, Christian y
RUIZ RIOL, Marta

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Método para monitorizar las respuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC) mediante una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado usando epítopos de LTC definidos**

57 Resumen:

Método para monitorizar las respuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC) mediante una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado usando epítopos de LTC definidos.

La presente invención se refiere a un método in vivo para monitorizar las repuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC) induciendo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) usando epítopos de LTC definidos. Se refiere además a los epítopos y sus kits.

ES 2 490 915 B1

Método para monitorizar las respuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC) mediante una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado usando epítomos de LTC definidos.

DESCRIPCIÓN

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método *in vivo* para monitorizar las respuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC) induciendo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) usando epítomos de LTC definidos. La invención también se refiere a un kit que
10 contiene dichos epítomos de LTC definidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los ensayos de seguimiento inmunitario sencillos y precisos que miden la(s) función(es) efectora(s) fisiológicamente relevantes de respuestas de células T y B inducidas
15 por vacunas son un prerequisite para el desarrollo eficaz de vacunas contra VIH. Sin embargo, el diseño de tales ensayos está dificultado por la ausencia de correlaciones inmunitarias bien definidas del control vírico en sujetos con VIH y otros asuntos. Véase, Prado J, *et al.*, Curr. Med. Chem. 2011; 18(26):3963-3970. El desarrollo con éxito de tales planteamientos de monitorización inmunitaria se beneficiaría también de un entendimiento
20 mejorado sobre cómo las células reactivas median sus efectos *in vivo* y cuáles de sus muchas funciones efectoras pueden estar más estrechamente unidas a su eficacia *in vivo*. En los ensayos de vacunas actuales, se emplean intensivos ensayos de laboratorio *ex vivo* e *in vitro* para medir la inmunidad de células T inducidas por la vacuna. Estos incluyen análisis por citometría de flujo que evalúan la producción de citoquinas y la capacidad de
25 desgranulación, el potencial de las células para inhibir la replicación vírica *in vitro*, y ensayos ELISpot que permiten probar grandes números de antígenos, a pesar de su foco muy limitado. Véase, Koup R, *et al.*, PLoS One 2010; 5(2):e9015 y Yang O, *et al.*, Trends Immunol. 2003; 24(2):67-72. Ninguno de estos ensayos ha definido inequívocamente marcadores de un control inmunitario durable en sujetos crónicamente infectados por VIH.
30 Mientras que varios ensayos (por ejemplo, ELISpot de citoquina única, detección por citometría de flujo de la producción intracelular de citoquinas) se puede usar para evaluar la magnitud y amplitud de las respuestas inducidas por la vacuna, es improbable que muestren las funciones efectoras que son cruciales para una respuesta eficaz *in vivo*. Por tanto, se necesita desarrollar ensayos alternativos, que midan de los efectos antivíricos más
35 directamente o evaluando la funcionalidad de las células efectoras. Para grandes ensayos de eficacia de vacunas, también se necesita que tales ensayos sean aplicables en marcos

de pocos recursos, sin infraestructura extensa, y que mantengan su sensibilidad y especificidad.

Las respuestas inmunitarias a algunas vacunas se prueban midiendo las reacciones cutáneas a la exposición intradérmica de antígenos, lo que permite evaluar la inmunocompetencia a agentes infecciosos después de infecciones o inmunizaciones previas. Véase, Birx D, *et al.*, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1993; 6(11):1248-1257, Palmer D, *et al.*, J. Infect. Dis. 1974; 130(2):138-143, y Palmer D, *et al.*, J. Infect. Dis. 1974; 130(2):132-137. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) se manifiestan clínicamente como un área de induración y eritema alrededor del sitio de inyección del antígeno y que se vuelve visible generalmente a las 24-72 horas después de la inyección del antígeno. El infiltrado celular local está dominado por macrófagos y linfocitos T, comúnmente asociados con perfil de citoquinas Th1. Como la inducción de reacción de DTH generalmente se dirige hacia la detección de inmunidad mediada por células T CD4, no existe una prueba similar ampliamente usada y sencilla para evaluar específicamente la presencia de células T citotóxicas CD8. Véase, Hladik F, *et al.*, J. Immunol. 2001; 166(5):3580-3588. Sin embargo, cuando se han inyectado en ratones péptidos bien caracterizados con epítomos restringidos a MHC de clase I, se han observado infiltrados intradérmicos de células T CD4+ y CD8+, lo que sugiere que epítomos de células T CD8 cortos, óptimamente definidos, también podrían provocar tales respuestas DTH por sí mismos. Véase, Kundig T, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89(16):7757-7761. En efecto, la inyección de epítomos derivados de cáncer en la piel de receptores de vacunas contra el cáncer mostró la presencia de células T CD8 específicas de antígenos CD8, lo que indica que al menos las respuestas inducidas por vacunas a autoantígenos se pueden detectar por medio de reacciones DTH. Véase, Chen Q, *et al.*, Cancer Immun. 2005; 5:5. Además, se considera que las reacciones alérgicas a la penicilina y sus derivados están mediadas en gran parte por células T CD8 que reaccionan a los epítomos de clase I haptenizados y que también provocan una reacción DTH tras la administración intradérmica de penicilina. Véase, Brander C, *et al.*, J. Immunol. 1995; 155(5):2670-2678. Sin embargo, no hay datos en seres humanos donde se haya probado el potencial de epítomos de LTC definidos de diferentes virus para inducir reacciones DTH y que habrían unido la reactividad DTH al control vírico *in vivo* relativo.

FIGURAS **Figura 1.** A) Ejemplo representativo de respuesta DTH 72h después de la administración intradérmica de PBS, Candida, péptido del virus de la gripe GL9, péptido de VIH SL9 y toxoide tetánico (TT). B) Se muestra el grado de DTH (determinado como el diámetro de la induración (mm)) para todos los sujetos que expresan HLA-A2 incluidos en el

estudio. Los símbolos negros indican sujetos sin infectar con VIH, los símbolos blancos representan los pacientes infectados con VIH.

Figura 2. A) Ejemplo representativo de la estrategia de separación con tinción positiva (medio) y negativa (derecha) con dextrámero para poblaciones de células T específicas de SL9 y GL9. B) Porcentajes de células positivas CD3CD8SL9 y CD3CD8GL9 que expresan los marcadores de maduración CCR7 y CD45RA. Las células indiferenciadas se definen como CCR7+CD45RA^{high}, las células de memoria centrales (CM) como CCR7+CD45RA^{low}, las células de memoria efectoras (EM) como CCR7- y las células de memoria efectoras terminalmente diferenciadas (EMRA) como CCR7-CD45RA^{high}. El panel de la derecha muestra la comparación directa de la frecuencia de células de memoria centrales entre células positivas para SL9 y GL9. C) Nivel de expresión de CD27 expresada en subconjuntos de células T específicas para SL9 y GL9. Se indica la intensidad de fluorescencia media (IFM), con foco especial en las células de memoria efectoras terminalmente diferenciadas a mano derecha.

Figura 3. A) Diferencias en la expresión de CLA entre poblaciones específicas de epítomos, mostradas como porcentajes de todas las células específicas de epítomos (paneles izquierdos) y niveles de IFM (paneles derechos Y) para los tiempos tanto de antes de la inyección del epítomo como para las 72 horas después de la inyección. B) Nivel de expresión de CD103 en células específicas de epítomo mostrado como intensidad de fluorescencia media (IFM) en los tiempos de antes de la inyección del epítomo y 72 horas después de la inyección. El porcentaje de células positivas no se muestra ya que no se diferenció entre LTC específicos de epítomo (valor de p: 0,7622 Mann-Whitney). C) Expresión de BLT1 (paneles izquierdos) y CXCR1 (paneles derechos) entre LTC específicos de epítomos mostrada como porcentaje de células con niveles de expresión en superficie detectable, en los tiempos tanto de antes de la inyección del epítomo como 72 horas después de la inyección.

COMPENDIO DE LA INVENCION La presente invención se refiere a un método *in vivo* para monitorizar la respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) contra un virus en un sujeto. El método comprende los pasos de i) administrar un epítomo restringido a HLA-A2 de un antígeno vírico al sujeto, y ii) determinar si se produce una reacción DTH cutánea, en donde una reacción DTH positiva es indicativa de que el sujeto puede montar una respuesta de LTC eficaz contra el virus. El método implica administrar el epítomo antigénico por vía intradérmica al sujeto y observar si se produce induración y eritema después de 48-72 horas tras la inyección. Una respuesta positiva significa que el sujeto se ha expuesto al antígeno al menos de 4 a 6 semanas antes de la administración y que su mecanismo de inmunidad

celular es eficaz en reconocer y responder al antígeno. La falta de una respuesta de DTH al antígeno se debe considerar como una evidencia de anergia. En ausencia de enfermedades subyacentes, la anergia puede indicar inmunodeficiencia primaria o secundaria de células T.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit o composición que comprende un epítipo restringido a HLA-A2 de la invención para ensayar la respuesta inmunitaria de LTC en un sujeto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Se cree que la inducción de LTC es un mecanismo de defensa importante contra infecciones víricas. Sin embargo, su eficacia *in vivo* puede variar en diferentes infecciones. Además, su evaluación funcional *in vitro* con frecuencia se basa en marcadores indirectos, tal como la liberación de una única citoquina, que puede ser fisiológicamente bastante irrelevante. La disponibilidad de pruebas *in vivo* simples, sensibles, específicas y fisiológicamente informativas, aplicables a seres humanos, facilitaría mucho la monitorización inmunitaria en grandes ensayos de vacunas.

La presente invención demuestra que las reacciones DTH locales se pueden provocar por epítopos de LTC cortos solos y que las diferencias en los marcadores de migración dérmicos entre LTC específicos de VIH y gripe podrían reflejar la funcionalidad *in vivo* alterada de LTC específicos de VIH. Estos datos pueden ayudar para establecer "LTC-DTH" como una herramienta de seguimiento inmunitario simple, barata y sensible para ensayos de vacunas a gran escala para VIH y otros patógenos víricos.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método *in vivo* para monitorizar la respuesta de LTC contra virus administrando a un sujeto un epítipo de LTC restringido a HLA-A2 de un antígeno vírico y observar si se induce una respuesta DTH. Se prepararon dos epítopos de LTC restringidos a HLA-A2 GMP óptimamente definidos del virus de la gripe (GL9 GILGFVFTL) y VIH (SL9, SLYNTVATL) para provocar una reacción DTH cutánea. Los epítopos se administraron al sujeto por vía intradérmica y se observó la aparición de induración y eritema. El GL9 fue capaz de inducir tal reacción DTH exclusivamente en individuos que expresan HLA-A2. Ninguna magnitud de las respuestas específicas de epítopos, estado de la infección por VIH, cargas víricas de VIH o recuentos de CD4 eran predictivas del grado de las reacciones DTH. Sin embargo, una expresión marcadamente reducida de los marcadores de emigración de la piel CD103 y el antígeno leucocítico cutáneo (CLA) en poblaciones específicas de epítipo estaba asociada con una falta de reactividad DTH de SL9. Los datos demuestran que las reacciones DTH pueden ser provocadas por epítopos de LTC óptimamente definidos por sí. Este hecho puede proporcionar la base para el desarrollo de planteamientos novedosos para la eficacia inmunitaria de ensayos de vacunas (contra VIH) a gran escala.

1. *Definiciones de términos y expresiones generales*

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

El término "adyuvante" se refiere a una sustancia que intensifica, aumenta o potencia la respuesta inmunitaria del huésped a un antígeno de vacuna bien contribuyendo a presentar el antígeno de la vacuna al sistema inmunitario o estimulando de forma no específica directamente diferentes componentes del sistema inmunitario.

El término "célula B", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares que se desarrollan en la médula ósea y que median la respuesta inmunitaria humoral del sistema inmunitario adaptativo. Las células B se caracterizan por la presencia de un receptor de células B que puede unirse específicamente a un antígeno. Sus funciones principales son hacer anticuerpos contra antígenos, realizar el papel de células presentadoras de antígenos (CPA) y por último desarrollarse a células B de memoria después de la activación por la interacción con el antígeno. Véase, Alberts B, *et al.*, "Molecular Biology of the Cell" (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, EE UU, 2008, pp. 1363-1391).

El término "BLT1", como se usa en el presente documento, se refiere al receptor 1 del leucotrieno B₄, una proteína codificada por el gen LTB₄R en seres humanos (No. de acceso en UniProt Q15722).

El término "CCR7", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 197, la proteína del receptor de quimioquina C-C de tipo 7. CCR7 se expresa en varios tejidos linfoides y activa células B y T. Se ha mostrado que controla la migración de las células T de memoria orientada a órganos linfáticos secundarios, tal como linfático, así como que estimula la maduración de células dendríticas (No. de acceso en UniProt P32248).

El término "CD3", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 3, un complejo proteico compuesto de cuatro cadenas distintas. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , y dos cadenas CD3 ϵ . Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de células T (TCR) y la cadena ζ para generar una señal de activación en linfocitos T. El TCR, la cadena

ζ y las moléculas de CD3 juntas comprenden el complejo TCR (No. de acceso de UniProt P07766).

El término “CD8”, como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 8, una glicoproteína transmembrana que sirve como un correceptor para el receptor de células T (TCR) expresado en las células T citotóxicas (LTC). Los LTC están implicados en el rechazo de trasplantes y la destrucción de células tumorales e infectadas con virus (No. de acceso de UniProt P10966).

El término “CD27”, como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 27, un miembro del receptor de factor de necrosis tumoral de la superfamilia del receptor de TNF. Este receptor se requiere para la generación y el mantenimiento a largo plazo de la inmunidad de células T. Se une al ligando CD70, y desempeña un papel clave en la regulación de la activación de células B y síntesis de inmunoglobulinas. El receptor transduce señales que producen la activación de NF-κB y MAPK8/JNK. Se ha mostrado que las proteínas adaptadoras TRAF2 y TRAF5 median el proceso de señalización de este receptor (Identificación HGNC No. 11922).

El término “CD45RA”, como se usa en el presente documento, se refiere a la isoforma RA del grupo de diferenciación 45, o proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, C (PTPRC). CD45RA se expresa por células T indiferenciadas (No. de acceso de UniProt P08575).

El término “CD103”, como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 103, o integrina αE (ITGAE). CD103 se une a la integrina β7 para formar la molécula de integrina heterodimérica completa αEβ7 (No. de acceso de UniProt P38570).

El término “CLA”, como se usa en el presente documento, se refiere al antígeno asociado a linfocito cutáneo, un receptor de emigración de la piel que facilita el direccionamiento de células T a la piel inflamada. CLA se define por su reactividad hacia el anticuerpo monoclonal HECA-452 y su actividad como un ligando para E-selectina. Véase, Fuhlbrigge R, *et al.*, Nature 1997; 389(6654):978-981.

El término “comprender” o “comprende”, como se usa en el presente documento, divulga también “consistir en” según la práctica de patentes generalmente aceptada.

Los términos “linfocito T citotóxico” o “LTC” se refieren a linfocitos que inducen apoptosis en células diana. Los LTC forman conjugados específicos de antígeno con células diana mediante la interacción de los TCR con antígeno procesado (Ag) en las superficies de las células diana, lo que produce apoptosis de la célula diana. Los cuerpos apoptóticos son eliminados por macrófagos.

El término “respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC)”, como se usa en el presente documento, se usa para referirse a la respuesta inmunitaria primaria mediada por células

LTC. Esta respuesta inmunitaria específica puede ser, por ejemplo, la producción de citoquinas específicas tal como IFN-gamma (IFN-gamma, IFN- γ) (medido, por ejemplo, por ELISPOT o FACS intracelular), desgranulación (medida, por ejemplo, por un ELISPOT específico de granzima b) o actividad citolítica (por ejemplo, medida por un ensayo de liberación de ^{51}Cr). De forma alternativa, la célula CD8+ específica de antígeno se puede detectar directamente mediante, por ejemplo, el uso de tetrámeros.

El término "CXCR1" o "CD181", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 181, también conocido como receptor α de interleuquina 8 (IL8A). CXCR1 es un receptor de quimioquina con alta afinidad por interleuquina 8 (IL8). La proteína codificada por el gen CXCR1 es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (No. de acceso en UniProt P25024).

El término "hipersensibilidad de tipo retardado" o "DTH", como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta celular que se desarrolla de dos a tres días después de la exposición a un antígeno. En una respuesta DTH las células T auxiliares CD4+ reconocen el antígeno en un complejo con el complejo HLA de clase 2. Las células presentadoras de antígeno en este caso son macrófagos que secretan IL-12, que además estimula la proliferación de células Th1 CD4+. Las células T CD4+ secretan IL-2 e interferón gamma, lo que induce la liberación de otras citoquinas Th1, mediando así la respuesta inmunitaria. Las células T CD8+ activadas destruyen las células diana al entrar en contacto, mientras que los macrófagos activados producen enzimas hidrolíticas y, en la presentación con ciertos patógenos intracelulares, se transforman en células gigantes multinucleadas.

El término "diagnóstico" como se usa en el presente documento, se refiere a la identificación de un estado molecular o patológico, enfermedad o afección o para referirse a la identificación de un paciente que se puede beneficiar de una pauta de tratamiento particular. Como entenderán los expertos en la materia, tal evaluación habitualmente no se pretende que sea correcta para todos (es decir, el 100 por cien) de los sujetos que se van a identificar. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se puedan identificar (por ejemplo una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin más usando diferentes herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de la t de Student, la de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 90 por cien, al menos el 95 por cien, al menos el 97 por cien, al menos el 98 por cien o al menos el 99 por cien. Los valores de p son preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferiblemente, al menos el 60 por cien, al menos el 70 por

cien, al menos el 80 por cien, o al menos el 90 por cien de los sujetos de una población se pueden identificar adecuadamente por el método de la presente invención.

Los términos “HLA-A2” se refiere al tipo HLA-A2 que contiene los subtipos, cuyos ejemplos incluyen, pero no están limitados a, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 y HLA-A*0250.

El término “péptido restringido a HLA-A2”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido que comprende un epítipo que puede, o se predice que puede, unirse a una molécula de antígeno de leucocito humano de HLA de clase II.

Preferiblemente, la unión del péptido restringido a HLA-A2 a la molécula de HLA de clase II se produce con una CI_{50} menor de 1000 nM. El “péptido restringido a HLA-A2” tiene aproximadamente de 8 a aproximadamente 13 aminoácidos o aproximadamente 8, 9, 10 u 11 aminoácidos de longitud. En ciertas formas de realización, uno o más de dichos péptidos restringidos a HLA-A2 se proporcionan juntos en forma de un péptido o construcción

poliepítipo. La construcción poliepítipo de la presente invención preferiblemente incluye 2 o más, 5 o más, 10 o más, 13 o más, 15 o más, 20 o más, o 25 o más epítopos de LTC. Más específico, la construcción poliepítipo comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60 o más epítopos de LTC. El

“péptido restringido a HLA-A2” puede ser de cualquier tamaño, incluyendo pero no limitado a que tenga un tamaño de menos de 100.000 dalton de peso molecular, menos de 50.00 dalton de peso molecular, menos de 10.000 dalton de peso molecular, menos de 5.000 dalton de peso molecular, menos de 2.500 dalton de peso molecular, o desde aproximadamente 1000 a 2000 dalton de peso molecular. En ciertas formas de realización,

el péptido restringido a HLA-A2 deriva de un antígeno del virus de la gripe. Un antígeno del virus de la gripe adecuado puede ser un antígeno de superficie, tal como hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), M2 o un fragmento de los mismos (por ejemplo, uno o más epítopos de LTA o LTC). Otros antígenos adecuados del virus de la gripe incluyen M1, NP, NS1, NS2, PA, PB1 y PB2, o fragmentos de los mismos. Los péptidos restringidos a HLA-A2

adecuados derivados de M1 incluyen GILGFVFTL (SEQ ID NO:1), LLTEVETYV (SEQ ID NO:2), ILGFVFTLTV (SEQ ID NO:3) y RMGTVTTEV (SEQ ID NO:4). Los péptidos restringidos a HLA-A2 adecuados derivados de HA incluyen, sin limitación GLFGAIAGFI (SEQ ID NO:5), FLDIWTYNA (SEQ ID NO:6), ALSTLCLLI (SEQ ID NO:7) y HLECRTFFL (SEQ ID NO:8). Los péptidos restringidos a HLA-A2 adecuados derivados de NP incluyen

KSCLPACVY (SEQ ID NO:9), CLPACVYGL (SEQ ID NO:10), LQNSQVFSL (SEQ ID NO:11) y FQGRGVFEL (SEQ ID NO:12). Los péptidos restringidos a HLA-A2 adecuados derivados

de NS1 incluyen, sin limitación, FQVDCFLWHV (SEQ ID NO:13), QVDCFLWHV (SEQ ID NO:14), FLWHVRKQV (SEQ ID NO:15), y IILKANFSV (SEQ ID NO:16). Los péptidos restringidos a HLA-A2 adecuados derivados de NS2 incluyen, sin limitación, FMQALQLLL (SEQ ID NO:17), MQALQLLLEV (SEQ ID NO:18) y MITQFESLK (SEQ ID NO:19). Los

5 péptidos restringidos a HLA-A2 adecuados derivados de PA incluyen, sin limitación, FMYSDFHFI (SEQ ID NO:20), ALLKHRFEI (SEQ ID NO:21), MAWTVVNSI (SEQ ID NO:22), LLMDALKLSI (SEQ ID NO:23), LLAWKQVLA (SEQ ID NO:24) y YINTALLNA (SEQ ID NO:25). Los péptidos restringidos a HLA-A2 adecuados derivados de PA incluyen, sin limitación, AQTDCVLEA (SEQ ID NO:26), CVLEAMAFL (SEQ ID NO:27), RLIDFLKDV (SEQ

10 ID NO:28), QIRGFVYFV (SEQ ID NO:29), FVYFVETLA (SEQ ID NO:30), RMFLAMITYI (SEQ ID NO:31), LLIDGTASL (SEQ ID NO:32), NMLSTVLGV (SEQ ID NO:33), FVANFSMEL (SEQ ID NO:34), AQMALQLFI (SEQ ID NO:35), y RLCNPLNPFV (SEQ ID NO:36). Los péptidos restringidos a HLA-A2 adecuados derivados de PA incluyen, sin limitación, LQDCKIAPL (SEQ ID NO:37), FQNWGIEHI (SEQ ID NO:38), FQNWGIEPI (SEQ

15 ID NO:39) y RMQFSSLTV (SEQ ID NO:40).

El término “VIH”, como se usa en el presente documento, incluye VIH-1, VIH-2 y VIS. “VIH-1” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. VIH-1 incluye, pero no está limitado a, partículas extracelulares de virus y formas de VIH-1 asociadas con células infectadas con VIH-1. El virus VIH-1 puede representar cualquiera de los subtipos

20 principales conocidos (clases A, B, C, D, E, F, G y H) o el subtipo atípico (grupo O) incluyendo cepas de laboratorio y aislados primarios. “VIH-2” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2. VIH-2 incluye pero no está limitado a partículas extracelulares de virus y formas de VIH-2 asociadas con células infectadas con VIH-2. El término “VIS” se refiere al virus de la inmunodeficiencia simia que es un virus similar a VIH

25 que infecta monos, chimpancés y otros primates no humanos. El VIS incluye pero no está limitado a, partículas víricas extracelulares y formas de VIS asociadas con células infectadas por VIS.

El término “virus de la gripe”, como se usa en el presente documento, se refiere a un virus que puede producir gripe e incluye, pero no está limitado a, los virus de la gripe de tipo

30 A, tipo B y tipo C. Las cepas representativas que se asocian con la enfermedad en el hombre, cerdo y/o aves, incluyendo las cepas H1N1 (por ejemplo, A/Wilson-Smith/33, A/New Caledonia/20/99, A/cerdo Corea/S10/2004, A/Brevig Mission/1/1918, A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai, A/California/7/2009, A/California/05/2009, A/California/08/2009, A/Texas/04/2009, A/cerdo/Saskatchewan/18789/02, A/ánade/Alberta/130/2003,

35 A/ánade/Alberta/2001, A/cerdo/Cotes d'Armor/1482/99, A/cerdo/Betzig/2/2001, y/o A/pavo/Alemania/3/91), cepas H3N2 (por ejemplo, A/Perth/16/2009), cepas H2N2 (por

ejemplo, A/Japón/305/57, A/Ann Arbor/6/60, A/Canadá/720/05, A/ánade/NY/6750/78, A/ánade/Potsdam/177-4/83, y/o A/pato/Hokkaido/95/2001), cepas N3N2 (por ejemplo, A/Hong Kong/1/66, A/Charlottesville/03/2004, A/Canterbury/129/2005, A/Fujian/411/01-like, A/pato/Corea/S9/2003, A/cerdo/Texas/4199-2/98, A/pavo/Ohio/313053/2004, y/o

5 A/pavo/North Carolina/12344/03), cepas H5N1 (por ejemplo, A/cerdo/Shandong/2/03, A/ganso/Guangdong/1/96, A/pato/Hunan/114/05, A/VietNam/1203/2004, A/VietNam/DT-036/2005, A/Vietnam/1194/2004, A/Vietnam/1203/2004, A/Anhui/1/2005, A/Egipto/2321/2007, A/Egipto/3300-NAMRU3/2008, A/somormujo/Novosibirsk/29/2005, A/ánsar indio/Mondolia/1/05, A/gato/Tailandia/KU-02/04, A/Hong Kong/213/03,

10 A/pollo/Guangdong/174/04, y/o A/HK/159/97), cepas H6N1 (por ejemplo, A/cerceta/Hong Kong/1073/99), cepas H6N2 (por ejemplo, A/pollo/California/0139/2001, y/o A/arao/Suecia/3/2000), cepas H6N9 (por ejemplo, A/ganso/Hong Kong/W217/97), cepa H7N1 (por ejemplo, A/FPV/Rostock/34), cepas H7N3 (por ejemplo, A/pollo/British Columbia/04, y/o A/pavo/Italia/220158/2002), cepas H7N7 (por ejemplo, A/pollo/Países

15 Bajos/1/2003, A/Países Bajos/219/03, A/FPV/Dobson/27, y/o A/pollo/FPV/Weybridge), cepas H9N2 (por ejemplo, A/ave zancuda/Delaware/9/96, A/cerdo/Corea/S452/2004, A/pato/Hong Kong/Y439/97, A/Hong Kong/1073/99, A/HK/2108/2003, A/codorniz/Hong Kong/G1/97, A/pato/Hong Kong/Y280/97, A/pollo HK/FY23/03, y/o A/pollo HK/G9/97), y cepas del virus de la gripe B (por ejemplo, B/Brisbane/60/2008).

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

25 El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo, planta o animal, tal como seres humanos, un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otras especies de simios y monos), un animal de granja (por ejemplo, aves, peces, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos), un mamífero doméstico (por ejemplo, perros y gatos), o un animal de laboratorio (por ejemplo, roedores tal como ratones, ratas y cobayas).

30 El término no indica una edad o sexo particular. El término “sujeto” abarca un embrión y un feto.

35 El término “célula T”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de una población diversa de tipos de linfocitos morfológicamente similares que se desarrollan en el timo y que median la respuesta inmunitaria celular del sistema inmunitario adaptativo. Se caracterizan por la presencia de un receptor de células T en la superficie de la célula. Hay varios subconjuntos de células T, cada uno con una función distinta (es decir,

ayudante, de memoria, reguladora, citolítica natural). Véase, Alberts, 2008, anteriormente, pp. 1364-1374, 1392-1409.

El término “Treg” o “célula T reguladora”, como se usa en el presente documento se refiere a una célula T que expresa el marcador CD4 o CD25 al menos y que puede reducir o suprimir la actividad de una célula T. Este término incluye células T que producen niveles bajos de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-1, y que suprimen la activación del sistema inmunitario. Las células T reguladoras suprimen activamente la proliferación y producción de citoquinas de células TH₁, TH₂ o indiferenciadas que se han estimulado en cultivo con una señal activadora (por ejemplo, antígeno y células presentadoras de antígeno o con una señal que mimetiza el antígeno en el contexto de HLA, tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 más un anticuerpo anti-CD28). Las células Treg pueden expresar el marcador FoxP3.

2. *Método para monitorizar la respuesta de LTC*

En un primer aspecto la invención se refiere a un método *in vivo* para determinar si un sujeto puede montar una respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) eficaz contra un virus que comprende:

- i) administrar un péptido que comprende un epítipo restringido a HLA-A2 de un antígeno de dicho virus al sujeto, y
- ii) determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)

en donde una reacción DTH positiva es indicativa de que el sujeto puede montar una respuesta de LTC eficaz contra el virus.

En la fase i) del método para monitorizar la respuesta de LTC de la invención, se administra al sujeto un péptido que comprende un epítipo restringido a HLA-A2 de un antígeno de dicho virus. En una forma de realización el péptido se administra por vía intradérmica, típicamente de una forma similar a la prueba de Mantoux. El péptido se puede administrar por vía epidérmica. El péptido típicamente se administra mediante aguja, tal como por inyección, pero se puede administrar por otros métodos, tal como balística, por ejemplo las técnicas balísticas que se han usado para administrar ácidos nucleicos. La solicitud EPC publicada No. EP-A-0693119 describe técnicas que se pueden usar típicamente para administrar el péptido. En varios ejemplos, se administran de 0,001 a 1000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o de 0,1 a 10 µg de péptido. De forma alternativa, se puede administrar un agente que puede proporcionar el péptido *in vivo*. Por tanto, se puede administrar un polinucleótido capaz de expresar el polipéptido. El polinucleótido típicamente tiene cualquiera de las características del polinucleótido que se discuten posteriormente. El polipéptido se expresa a partir del polinucleótido *in vivo* y se puede medir el reconocimiento

del péptido in vivo. Típicamente se administran de 0,001 a 1000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o de 0,1 a 10 µg del polinucleótido. En una forma de realización preferida, el péptido se administra sin adyuvante. En una forma de realización preferida, el epítipo restringido a HLA-A2 deriva del virus de la gripe. En una forma de realización más preferida, el epítipo restringido a HLA-A2 deriva de la proteína de matriz 1 del virus de la gripe. En una forma de realización aún más preferida, el epítipo restringido a HLA-A2 es GILGFVFTL (SEQ ID NO: 1). Preferiblemente, el sujeto es humano. En una forma de realización preferida, el sujeto ha sido previamente infectado por el virus y/o inmunizado con un inmunógeno que comprende el antígeno vírico.

En la fase ii) del método para monitorizar la respuesta de LTC de la invención, el método comprende determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). En una forma de realización preferida, la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar la aparición de una reacción DTH cutánea. En una forma de realización más preferida, la reacción DTH cutánea se determina determinando la presencia de induración y/o eritema de un área que rodea un sitio de exposición al antígeno.

En otra forma de realización, la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CLA+ y/o el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CD103+. El aumento en el número de LTC específicos de epítipo CLA+ y/o el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CD103+ habitualmente se determina con respecto a un valor de referencia. En una forma de realización preferida, el valor de referencia corresponde al número de LTC específicos de epítipo CLA+ o el número de LTC específicos de epítipo CD103+ en un sujeto que no ha sido tratado o en un sujeto que ha sido tratado con un péptido que no comprende un epítipo restringido a HLA-A2 de un antígeno del virus.

3. *Métodos para el diagnóstico*

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de una infección por un virus en un sujeto que comprende

- i) administrar un péptido que comprende un epítipo restringido a HLA-A2 de un antígeno de dicho virus al sujeto, y
- ii) determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)

en donde una reacción DTH positiva es indicativa de que el sujeto está infectado por el virus.

En la fase i) del método para el diagnóstico de una infección vírica, se administra al sujeto un péptido que comprende un epítipo restringido a HLA-A2 de un antígeno de dicho virus. En una forma de realización el péptido se administra por vía intradérmica, típicamente de una forma similar a la prueba de Mantoux. El péptido se puede administrar por vía epidérmica. El péptido típicamente se administra mediante aguja, tal como por inyección, pero se puede administrar por otros métodos, tal como balística, por ejemplo las técnicas balísticas que se han usado para administrar ácidos nucleicos. La solicitud EPC publicada No. EP-A-0693119 describe técnicas que se pueden usar típicamente para administrar el péptido. En varios ejemplos, se administran de 0,001 a 1000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o de 0,1 a 10 µg de péptido. De forma alternativa, se puede administrar un agente que puede proporcionar los péptidos in vivo. Por tanto, se puede administrar un polinucleótido capaz de expresar el polipéptido. El polinucleótido típicamente tiene cualquiera de las características del polinucleótido que se discuten posteriormente. El polipéptido se expresa a partir del polinucleótido in vivo y se puede medir el reconocimiento del péptido in vivo. Típicamente se administran de 0,001 a 1000 µg, por ejemplo, de 0,01 a 100 µg o de 0,1 a 10 µg del polinucleótido. En una forma de realización preferida, el epítipo restringido a HLA-A2 deriva del virus de la gripe.

En una forma de realización más preferida, el epítipo restringido a HLA-A2 deriva de la proteína de matriz 1 del virus de la gripe. En una forma de realización aún más preferida, el epítipo restringido a HLA-A2 es GILGFVFTL (SEQ ID NO: 1). El epítipo restringido a HLA-A2 que deriva del virus de la gripe incluye, sin limitación, los epítipos GILGFVFTL (SEQ ID NO: 1), LLTEVETYV (SEQ ID NO: 2), ILGFVFTLTV (SEQ ID NO: 3) y RMGTVTTEV (SEQ ID NO:4).

Preferiblemente, el sujeto es humano. En una forma de realización más preferida, el sujeto ha sido previamente infectado por el virus y/o inmunizado con un inmunógeno que comprende el antígeno vírico.

En la fase ii) del método para el diagnóstico de una infección por un virus, el método comprende determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). En una forma de realización preferida, la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar la aparición de una reacción DTH cutánea. En una forma de realización más preferida, la reacción DTH cutánea se determina determinando la presencia de induración y/o eritema de un área que rodea un sitio de exposición al antígeno.

En otra forma de realización, la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CLA+ y/o el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CD103+. El

aumento en el número de LTC específicos de epítipo CLA+ y/o el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CD103+ habitualmente se determina con respecto a un valor de referencia. En una forma de realización preferida, el valor de referencia corresponde al número de LTC específicos de epítipo CLA+ o el número de LTC específicos de epítipo CD103+ en un sujeto que no ha sido tratado o en un sujeto que ha sido tratado con un péptido que no comprende un epítipo restringido a HLA-A2 de un antígeno del virus.

4. *Péptido que comprende al menos un epítipo restringido a HLA-A2 y kits*

En otro aspecto, la invención se refiere a un péptido que comprende al menos un epítipo restringido a HLA-A2 de la invención. En otra forma de realización, la invención se refiere a un kit que comprende un péptido según la invención.

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan al mismo en su totalidad mediante referencia.

Mientras que la invención anterior se ha descrito en algún detalle para fines de claridad y entendimiento, el experto en la materia apreciará de una lectura de esta divulgación que se pueden hacer varios cambios en forma y detalle son separarse del verdadero ámbito de la invención y reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Procedimientos generales

1. *Sujetos*

10 individuos infectados con VIH (9 HLA-A*0201+) y 10 no infectados con VIH (8 HLA-A*0201+) se inyectaron con epítopos solubles derivados de los virus de la gripe (proteína de matriz, SEQ ID NO. 1: GILGFVFTL, "GL9") y VIH (Gag p17, SEQ ID NO. 2: SLYNTVATL, "SL9"). El propósito de este planteamiento era evaluar su potencial para inducir reacciones DTH y provocar respuestas específicas a HLA-A*0201. También se incluyeron como controles PBS, toxoide tetánico, y antígenos de Candida. Véase, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00031075.htm>, Septiembre 2012, figura 1. Los epítopos víricos se inyectaron en 200 µl que contenían 100 µg de péptidos.

Las inyecciones control incluyeron inyecciones intradérmicas estándar de PBS, toxoide tetánico, y antígenos de Candida. Se midió la reacción cutánea en los sitios de inyección 72h después de la inyección palpando las induraciones en la piel y midiendo el diámetro (mm) de la extensión del eritema. Se obtuvieron muestras de sangre antes de la

inyección y 72h después de ella, las células T se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad (Lymphoprep®, Axis-Shield plc, Dundee, Escocia, GB) y se crioconservaron hasta su uso.

5 2. *Análisis por citometría de flujo*

Para el ensayo de dextrámero y el análisis de células T CD8, las células descongeladas (1 millón de PBMC) se tiñeron con 10 µl de dextrámero HLA-A2/GL9 acoplado a PE (Immudex AS, Copenhagen, DK) y 10 µl de dextrámero HLA-A2/SL9 acoplado a APC (Immudex AS, Copenhagen, DK) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se diluyeron los anticuerpos específicos para paneles de activación/diferenciación y emigración en solución salina tamponada con fosfato (PBS) más suero bovino fetal (SBF) al 1% y se añadieron durante otros 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. Véase la tabla 2. Las células se lavaron después dos veces y se resuspendieron en 200 µl de PBS más SBF al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo LSRII con un ajuste de adquisición de parámetros de 8 colores (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU). Los resultados se analizaron mediante el software FACSDiva (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU).

3. *Análisis estadístico*

Los análisis estadísticos se realizaron usando Prism Versión 4, GraphPad Prism. Se aplicó ANOVA unívoco con corrección de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las medidas de DTH. Se usó una prueba de Mann-Whitney para las comparaciones de MFI y porcentajes población. Para el análisis de los porcentajes de población y expresión de marcadores de fenotipo/emigración a diferentes tiempos, se aplicó la prueba de datos emparejados de Wilcoxon. En todos los análisis, los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo 1

Inducción de reacción DTH con antígenos de VIH y virus de la gripe

30

Para determinar si los epítomos de LTC por sí, administrados por vía intradérmica y sin adyuvante, pueden provocar una reacción DTH, se probaron 2 epítomos restringidos a HLA-A*0201 bien definidos derivados de VIH (SL9, SLYNTVATL) y el virus de la gripe (GL9, GILGFVFTL) en 10 individuos infectados con VIH (9 HLA-A*0201+) y 10 no infectados con VIH (8 HLA-A*0201+). Como controles, también se siguieron las respuestas DTH a PBS solo, toxoide tetánico (TT) y antígenos de Candida. Véase la figura 1A. No se observaron

35

reacciones dérmicas después de la inyección del epítipo SL9 en ninguno de los 9 individuos infectados con VIH que expresan HLA-A*0201, independientemente de su recuento de CD4 y cargas víricas de VIH. Como se esperaba, los sujetos no infectados con VIH no mostraron tampoco reacción a SL9. En contraste, 8 de los 8 individuos negativos para VIH (100%) y 4 de los 9 positivos para VIH (44%), que expresan HLA-A*0201 mostraron reacción a la inyección de GL9 (diámetro de la reacción induración que variaba de 3-15 mm). Véase, la tabla 1.

Mientras que las inyecciones control provocaron una respuesta en el 100% de los individuos no infectados por VIH, los pacientes infectados con VIH tenían una tasa de respuesta reducida también a estos antígenos (TT: 100% de VIH- frente al 90% de VIH+; Candida: 100% de VIH- frente al 80% de VIH+). Sin embargo, ninguna de estas diferencias, incluyendo la tasa de respuesta a GL9, alcanzó significación estadística (χ^2 : 0,6209 df: 2 y valor de p: 0,7331). Además, el grado de induración y eritema en los sitios de inyección del antígeno vírico no se correlacionaba con el estado de VIH, recuentos de CD4 o cargas víricas de VIH y no estaba asociado con el grado de reactividad DTH a los antígenos controles. Véase la figura 1B. Estos datos demostraban que al menos el epítipo de LTC derivado del virus de la gripe GL9, contra el que no se han documentado actividades de células T CD4, desencadena reacciones DTH robustas por sí mismo. La ausencia de reactividad DTH de GL9 en individuos sin el alelo HLA de clase I restrictivo indicaba que las respuestas *in vivo* eran específicas de epítipo y documenta además que las respuestas estaban mediadas por células T CD8 restringidas a HLA de clase I. Véase, Chen, 2005, anteriormente. El grado reducido de las reacciones DTH de GL9 en individuos infectados con VIH comparados con sujetos no infectados con VIH (los diámetros de induración en pacientes no infectados con VIH variaban de 3-15 mm, mediana 9 mm, y en pacientes infectados de 0 a 15, mediana 4,5 mm, valor de p: 0,0927) está en línea con las reactividades DTH disminuidas en sujetos infectados con VIH hacia antígenos tales como BCG. Véase, Johnson M, *et al.*, J. Infect. Dis. 1992; 166(1):194-198 y Costa N, *et al.*, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2011; 44(5):542-545. Sin embargo, la ausencia completa de reacciones DTH hacia SL9 en los sujetos infectados con VIH que expresan HLA-A2 era de alguna manera sorprendente ya que los análisis *ex vivo* por citometría de flujo mostraban respuestas específicas de epítipo fuertes (intervalo del porcentaje de LTC específicos de SL9 en sangre periférica: 0,2-7,5% de células T CD8 y mediana: 1,3%). Evidentemente, varias razones podrían explicar esta observación, incluyendo un efecto específico de epítipo SL9 que no se observaría para otro epítipo de LTC derivado de VIH. De forma alternativa, el tiempo necesario para observar una reacción DTH puede ser más largo para antígenos de VIH que para respuestas específicas al virus de la gripe, lo que lleva a que se

pasen por alto potenciales reactividades después de 72h. Véase Hladik, 2001, anteriormente. Estas y otras diferencias cualitativas en la respuesta de células T CD8 a estas dos infecciones pueden existir ya que sus vías de transmisión y capacidad para establecer infecciones crónicas se diferencian drásticamente. Por último, la ausencia de reacciones DTH a SL9 puede reflejar una funcionalidad generalmente reducida de respuestas de LTC específicas de VIH en individuos infectados crónicamente, un fenómeno que probablemente afectaría a la mayoría de las poblaciones de LTC específicos de VIH.

Ejemplo 2

Efecto de la maduración y diferenciación de LTC sobre la reacción DTH

Para evaluar si la diferente capacidad de LTC específicos de SL9 y GL9 para inducir reacciones DTH eran debidas a diferencias en sus fases de maduración y diferenciación relativa, poblaciones específicas de epítomos en la sangre periférica se analizaron por citometría de flujo. Estudios paralelos en sitios de DTH por biopsia en tres individuos no fueron posibles ya que esto produjo insuficiente material celular. Se tiñeron LTC específicos usando dextrámeros que contenían SL9 y GL9, respectivamente, junto con anticuerpos contra CD45RA, CCR7 y CD27. Las células se evaluaron en las muestras de sangre tomadas justo antes de la inyección del antígeno y 72h después cuando se midieron las reacciones DTH. La magnitud de la respuesta de SL9 generalmente fue mayor que la respuesta de GL9, tanto en el momento de la inyección del antígeno (t0, mediana de SL9 0,9% frente a GL9 0,6%, $p=0,0938$) como en el tiempo de 72h (mediana de SL9 1,9% frente a GL9 0,5%, $p=0,0313$). Sin embargo, no hubo cambio estadísticamente significativo en ninguna población a lo largo del tiempo (SL9 $p=0,6875$, GL9=1,000, prueba de datos emparejados de Wilcoxon) que se pudiera haber posiblemente desencadenado por las inyecciones de antígeno. La mayor magnitud de la respuesta de SL9 de VIH comparada con la respuesta de GL9 del virus de la gripe está en línea con artículos que han encontrado que las respuestas específicas de VIH generalmente son más fuertes que la respuesta de GL9 de magnitud relativamente baja. Véase, Brander C, *et al.*, Eur. J. Immunol. 1993; 23(12):3217-3223 y Brander C, *et al.*, J. Clin. Invest. 1998; 101(11):2559-2566.

El análisis de las fases de diferenciación de los subconjuntos de células T CD8 específicas de GL9 y SL9 mostraron frecuencias comparables de células indiferenciadas, de memoria efectoras y de memoria efectoras terminalmente diferenciadas para ambos subconjuntos. La diferencia estadísticamente significativa se observó para la población de células de memoria central (CM), con mayores proporciones de células específicas de GL9 que muestran este fenotipo (CCR7+/CD45RA-) que la vista entre células específicas de SL9

(mediana de GL9: 7,45% frente a mediana de SL9: 1,6%; valor de p: 0,0002 Mann-Whitney). Véase la figura 2B. Estos datos están en línea con comparaciones más exhaustivas de poblaciones de LTC contra diferentes patógenos víricos, que también han mostrado una dominación de CM en respuestas de LTC a la infección con el virus de la gripe y un fenotipo predominantemente EM y EMRA para LTC específicos de VIH. Véase, Appay V, *et al.*, Cytometry A 2008; 73(11):975-983. Es probable que estas discrepancias reflejen las diferencias en la estimulación crónica de antígeno en infección con VIH, que se ha descrito que lleva a la diferenciación de poblaciones de LTC específicas del virus a las fases terminalmente diferenciadas. Véase, Appay V. *et al.*, Nat. Med. 2002; 8(4):379-385. Esta interpretación está apoyada además por la expresión significativamente aumentada del marcador de activación CD27 en la superficie de células T de SL9 terminalmente diferenciadas comparadas con LTC específicas de GL9 del virus de la gripe en nuestra población de estudio (mediana de intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD27 para GL9 = 289,5 frente a mediana de SL9 = 474 IFM; valor de p: 0,0002 Mann-Whitney): Véase la figura 2C.

Ejemplo 3

Efecto de marcadores de migración dérmicos específicos sobre la reacción DTH

Para determinar si la reactividad DTH de LTC específicos de GL9 y SL9 dependía de la expresión de marcadores de migración dérmicos específicos, se evaluó la expresión de receptores de emigración previamente descritos en células T CD8 específicas de epítipo. Los marcadores ensayados incluían el antígeno asociado a linfocitos cutáneo (CLA), la integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103), el receptor del leucotrieno B4 (BLT1) y el receptor alfa de IL8, también conocido como CXCR1.

Se ha mostrado que CLA está presente en más del 80% de las células T que se infiltran en lesiones de piel inflamada, mientras que solo el 5-20% del total de células T en sangre periférica son CLA+. La expresión de CLA típicamente aumenta en individuos con diversas enfermedades inflamatorias y de la piel. Véase, Ogg G, *et al.*, J. Exp. Med. 1998; 188(6):1203-1208, Dworzak M, *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 103(5Pt1):901-906, Borowitz M, *et al.*, Leukemia 1993; 7(6):859-863, Seneviratne S, *et al.*, QJM 2007; 100(1):19-27, Antelo D, *et al.*, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 2011; 27(1):40-44, Sigmundsdottir H, *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 2001; 126(2):365-369, Koelle D, *et al.*, J. Clin. Invest. 2002; 110(4):537-548, y Koelle D, *et al.*, J. Virol. 2006; 80(6):2863-2872. En este ensayo la expresión de CLA aumentó selectivamente en los LTC específicos de GL9 (tanto en % de células positivas así como en la intensidad de la expresión por célula; mediana de

SL9 23,32% y de GL9 85,77% valor de $p < 0,0001$, Mann-Whitney; mediana de SL9 976 IFM y de GL9 3537,5 IFM, valor de $p < 0,0001$, Mann-Whitney). Esta diferencia era consistente tanto en el momento en que se inyectó el antígeno como en el punto de 72h de seguimiento. Véase la figura 3A. Los mayores niveles de CLA en las células CD8 específicas del virus de la gripe sugieren que este marcador podría ser responsable, o al menos requerido para las reacciones DTH observadas vistas contra GL9 pero no SL9.

La integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) se describió inicialmente en células T intraepiteliales que residen en el intestino y otros compartimentos epiteliales tal como la piel y los pulmones así como las amígdalas y, con su expresión sesgada hacia células T CD8+. CD103 aumenta por exposición a TGF β , IL4 y con estimulación con superantígenos pirogénicos estreptocócicos parcialmente coexpresados con CLA. Véase, Sigmundsdottir H, *et al.*, Clin. Immunol. 2004; 111(1):119-125, y Seneviratne S, *et al.*, Clin Exp Immunol 2005; 141(1):107-115. Los sujetos infectados con VIH mostraron resultados comparables (mediana de GL9: 100% frente a mediana de SL9: 99,95%; valor de p : 0,7622 Mann-Whitney), pero el nivel de expresión era significativamente mayor en LTC específicos de GL9 (mediana de GL9: 7116,5 IFM frente a mediana de SL9: 2388 IFM; valor de $p < 0,0001$ Mann-Whitney). Véase la figura 3B. Mientras que CD103 no se considera necesariamente un marcador de emigración, su expresión aumentada en células específicas de GL9 puede permitir retener estas células en las capas epiteliales, lo que facilita una reacción DTH rápida.

El aumento de leucotrieno B₄, el receptor del leucotrieno B₄ (BLT1) y CXCR1 (receptor α de IL8) se han observado en varias enfermedades inflamatorias, tales como asma, enfermedad alérgica y dermatitis atópica, caracterizadas por un microentorno de citoquinas de tipo Th2. Véase, Ohnishi H, *et al.*, Allergol. Int. 2008; 57(4):291-298, Stemmler S, *et al.*, Genes Immun. 2005; 6(3):225-230, Francis J, *et al.*, J. Immunol. 2004; 172(1):268-273, y Seneviratne, 2007, anteriormente. BLT1 se expresa principalmente en células T efectoras CD8+ mientras que las células T CD8+ con fenotipo CM expresan niveles menores de BLT1. Véase, Goodarzi K, *et al.*, Nat. Immunol. 2003; 4(10):965-973. Por otra parte, la expresión de CXCR1 está principalmente restringida a células T de memoria efectoras terminalmente diferenciadas, con expresión aumentada de perforina, granzima B e IFN- γ y alto potencial citotóxico. Véase, Takata H, *et al.*, J. Immunol. 2004; 173(4):2231-2235. Se ha detectado expresión elevada de CXCR1 en células T CD8 específicas de VIH de pacientes que controlan la replicación del VIH durante interrupciones estructuradas del tratamiento e identifica células con fuerte actividad citolítica y capacidad de ser reclutadas rápidamente a sitios de activación del sistema inmune innato. Véase, Hess C, *et al.*, Blood 2004; 104(12):3463-3471.

Basándose en las consideraciones previas y en datos experimentales anteriores, también se evaluaron los marcadores BLT1 y CXCR1 en LTC específicos de SL9 de VIH y GL9 del virus de la gripe. En contraste a la expresión de CLA y CD103, se encontró que ambos marcadores estaban elevados en células específicas de SL9 de VIH comparados con la población de LTC específica de GL9 (para la expresión de BLT1: mediana de GL9: 56,9% frente a mediana de SL9: 88,45%; valor de p: 0,0001; para CXCR1: mediana de GL9: 12,97% frente a mediana de SL9: 32,27%; valor de p <0,0001, Mann-Whitney). Véase la figura 3C. Como para CLA y CD103, la expresión de estos marcadores de emigración tisular inflamatorios no estaba modulada entre el momento de la inyección del antígeno y el tiempo de 72h tras la inyección, lo que sugiere que una gran fracción de GL9 y SL9 derivados de PBMC o bien no se estimulaban por la inyección intradérmica del antígeno o que las células específicas de SL9 expresan constitutivamente más BLT1 y CXCR1 que los LTC específicos de GL9. Por tanto, estos datos sugieren que ambos, CLA y CD103, pero no BLT1 o CXCR1, pueden estar implicados en fomentar la migración hacia o la retención de LTC específicos de GL9 en el sitio de inyección dérmica del antígeno. La ausencia de ambos de estos marcadores en células específicas de SL9 de VIH es consistente con la falta de reactividad DTH a este antígeno y puede indicar perfiles de funciones efectoras diferenciales de los LTC dirigidos contra estas infecciones víricas.

Tabla 1

Sujeto ID	HLA-A2	estado de HIV	recuentos de CD4	carga vírica de HIV	TARGA	Reacciones de la piel a la inyección de: (induración y diámetro de eritema -mm)				
						PBS control	Toxoide tetánico	Candida	péptido de gripe	péptido de HIV
DTH-1	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	11	9	12	0
DTH-2	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	9	11	15	0
DTH-3	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	13	8	14	0
DTH-4	-	-	N.D	n.a.	n.a.	0	8	6	0	0
DTH-5	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	6	9	7	0
DTH-6	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	5	11	10	0
DTH-7	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	12	12	8	0
DTH-8	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	10	13	3	0
DTH-9	+	-	N.D	n.a.	n.a.	0	12	9	5	0
DTH-10	-	-	N.D	n.a.	n.a.	0	11	8	0	0

ES 2 490 915 B1

<i>DTH-11</i>	+	+	174	200	-	0	0	8	0	0
<i>DTH-12</i>	-	+	140	8630	+	0	7	5	0	0
<i>DTH-13</i>	+	+	402	21242	+	0	3	9	0	0
<i>DTH-14</i>	+	+	793	<50	+	0	6	7	5	0
<i>DTH-15</i>	+	+	1150	<50	+	0	6	8	4	0
<i>DTH-16</i>	+	+	129	4438	+	0	13	5	14	0
<i>DTH-17</i>	+	+	N.D	<50	+	0	9	0	0	0
<i>DTH-18</i>	+	+	190	123427	-	0	8	>15	6	0
<i>DTH-19</i>	+	+	449	<50	+	0	>15	>15	15	0
<i>DTH-20</i>	+	+	436	7690	-	0	12	0	0	0

N.D: No disponible

n.a: no aplicable

Tabla 2

Marcadores	Clon	Isotipo	Fluorocromo	
TINCIÓN DE DEXTRÁMERO				
GL9 Dextrámero			R-PE	Immudex
SL9 Dextrámero			APC	Immudex
CD3	SK7	Ratón IgG1,κ	APC-Cy7	BD
CD8	SK1	Ratón IgG1,κ	Amcyam	BD
CCR7	3D12	Rata IgG2a, κ	PeCy7	BD
Marcadores de activación				
CD45RA	HI100	Ratón IgG2b,κ	PeCy5	BD
CD27	M-T271	Ratón IgG1,κ	V450	BD
Marcadores de emigración				
CLA	HECA-452	Rata IgM, κ	FITC	BD
CD103	Ver-ACT8	Ratón IgG1,κ	FITC	BD
CXCR1	5A12	Ratón IgG2b,κ	PeCy5	BD
BLTRbiot	203/14F11	Ratón IgG1	Strept.V450	BD

Fuentes: Immudex AS (Copenhague, DK), BD Biosciences Corp (Franklin Lakes, NJ, EE UU)

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido restringido a HLA-de un antígeno de un virus de la gripe o del HIV, para la fabricación de un producto diagnóstico para determinar si un sujeto puede montar una respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) eficaz contra dicho virus, en donde la determinación de dicha respuesta comprende determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde el péptido restringido a HLA-A2 es un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 40.
3. El uso de la reivindicación 2, en donde el péptido restringido a HLA-A2 es SEQ ID NO. 1.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el péptido se administra sin adyuvante.
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el péptido se administra por vía intradérmica.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el sujeto ha sido infectado previamente por el virus y/o inmunizado con un inmunógeno que comprende el antígeno vírico.
7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar la aparición de una reacción DTH cutánea.
8. El uso de la reivindicación 7 en donde la reacción DTH cutánea se determina determinando la presencia de induración y/o eritema en un área que rodea un sitio de exposición al antígeno.
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CLA+ y/o el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CD103+.

10. El uso como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el sujeto es humano.
- 5 11. Uso de un péptido restringido a HLA-A2 de un antígeno del virus de la gripe o del HIV, para la fabricación de un producto diagnóstico para determinar una infección por dicho virus, en donde la determinación de dicha infección comprende determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DHT).
- 10 12. El uso de la reivindicación 11, en donde el péptido restringido a HLA-A2 es seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 40.
13. El uso de la reivindicación 12, en donde el péptido restringido a HLA-A2 es un epítipo del virus de la gripe y la infección que se va a diagnosticar es una infección por el virus de la gripe.
- 15 14. El uso de la reivindicación 13, en donde el péptido restringido a HLA-A2 es SEQ ID NO. 1.
- 20 15. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en donde el péptido se administra sin adyuvante.
16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en donde el péptido se administra por vía intradérmica.
- 25 17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 en donde la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar la aparición de una reacción DTH cutánea.
- 30 18. El uso de la reivindicación 17 en donde la reacción DTH cutánea se determina por la presencia de induración y/o eritema en un área que rodea un sitio de exposición al antígeno.
- 35 19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18 en donde la determinación de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) comprende determinar el

aumento en el número de LTC específicos de epítipo CLA+ y/o el aumento en el número de LTC específicos de epítipo CD103+.

20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde el sujeto es humano.

5

21. Un péptido que comprende el epítipo restringido a HLA-A2 de SEQ ID NO. 1.

22. Un kit que comprende el péptido de la reivindicación 21.

A)

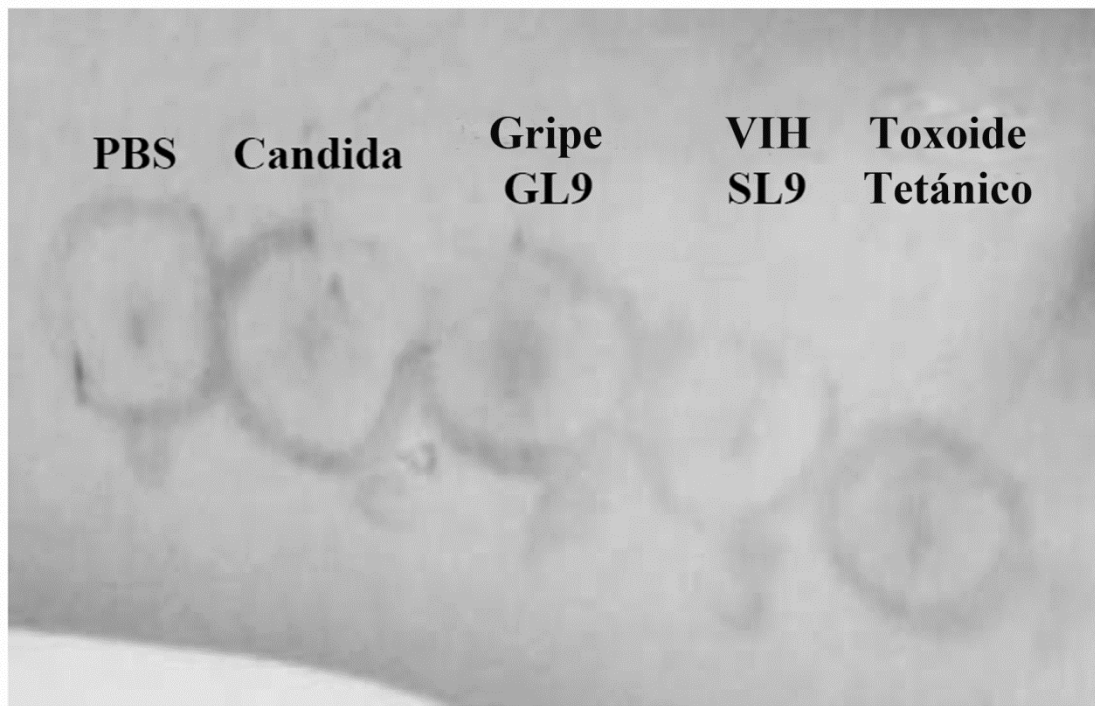


Fig. 1

B)

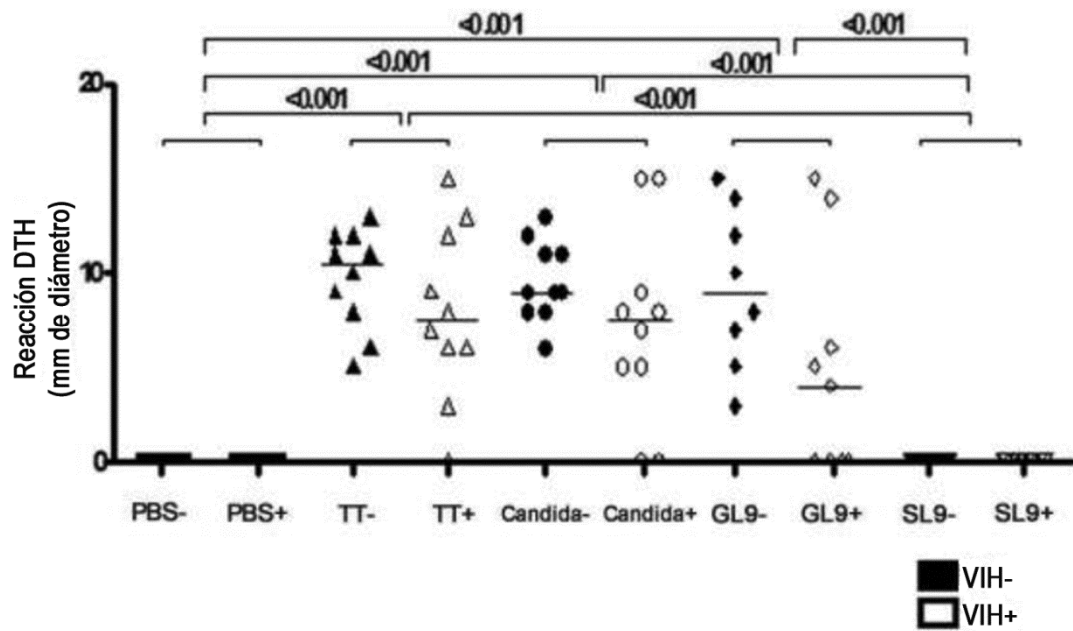
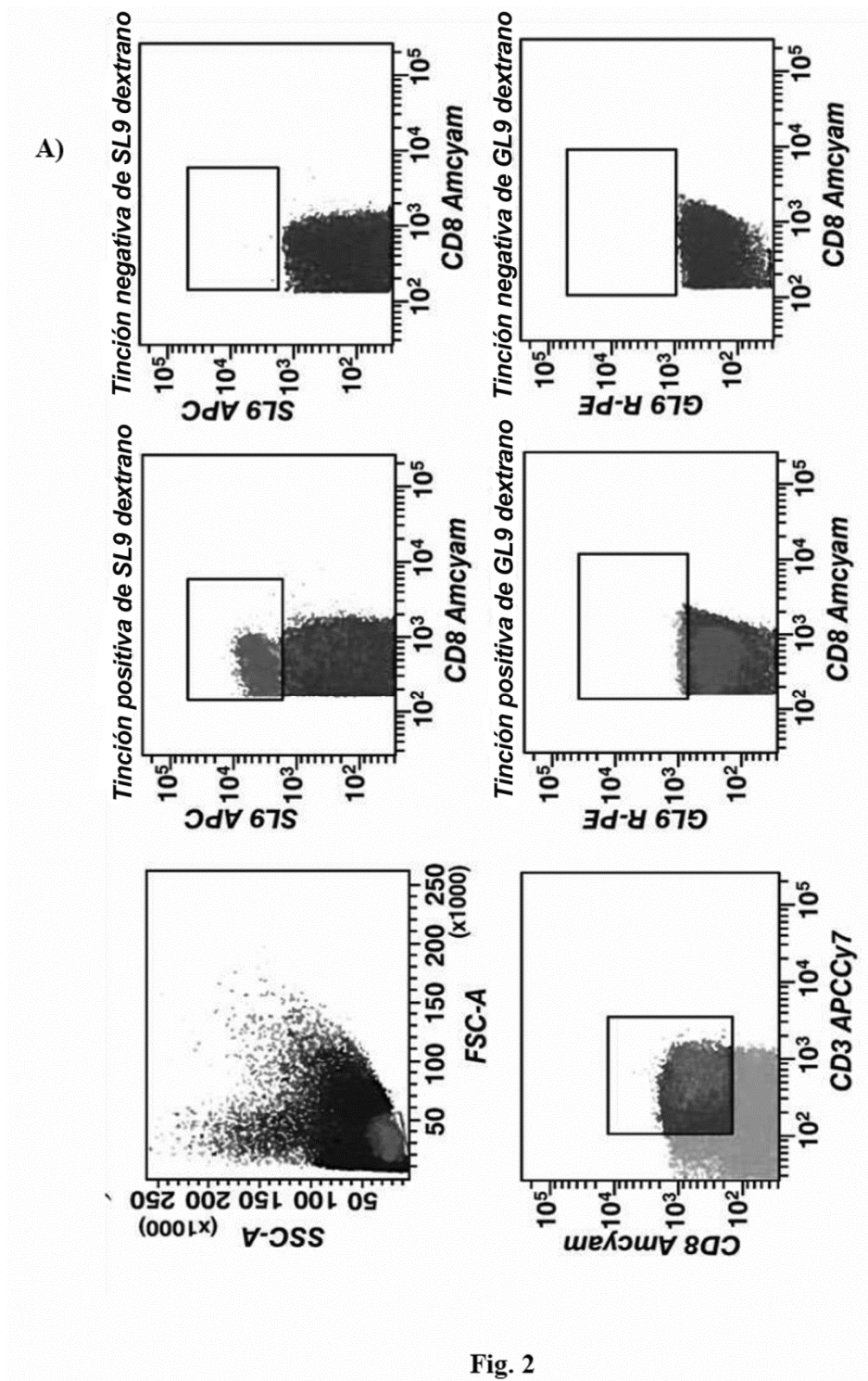
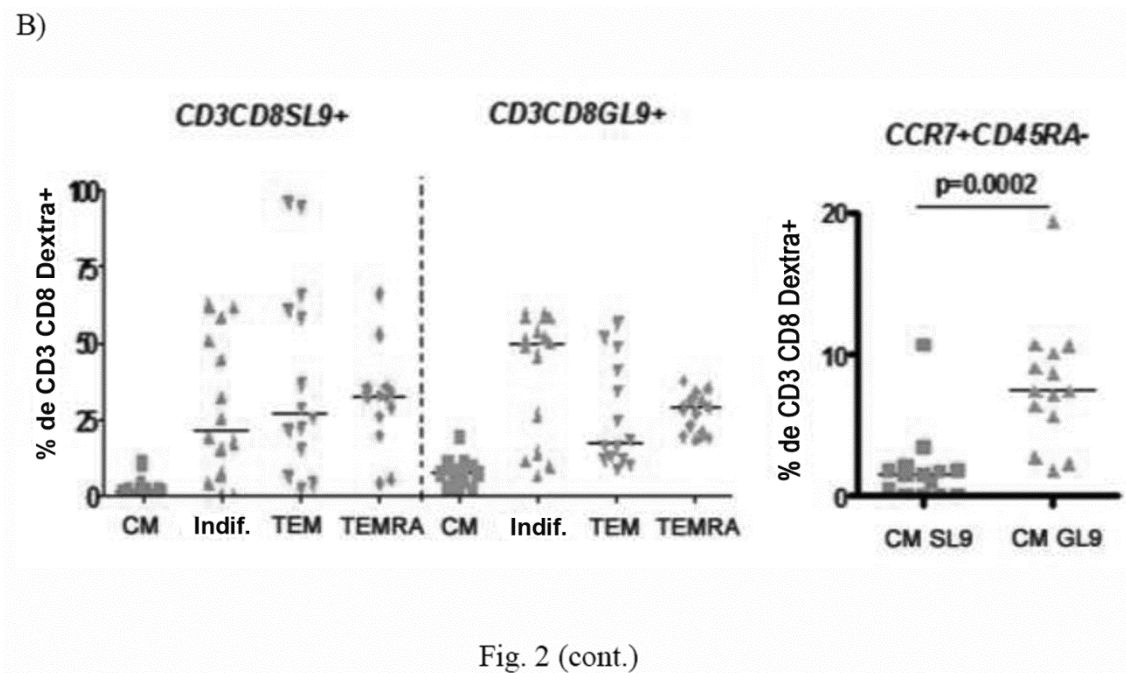
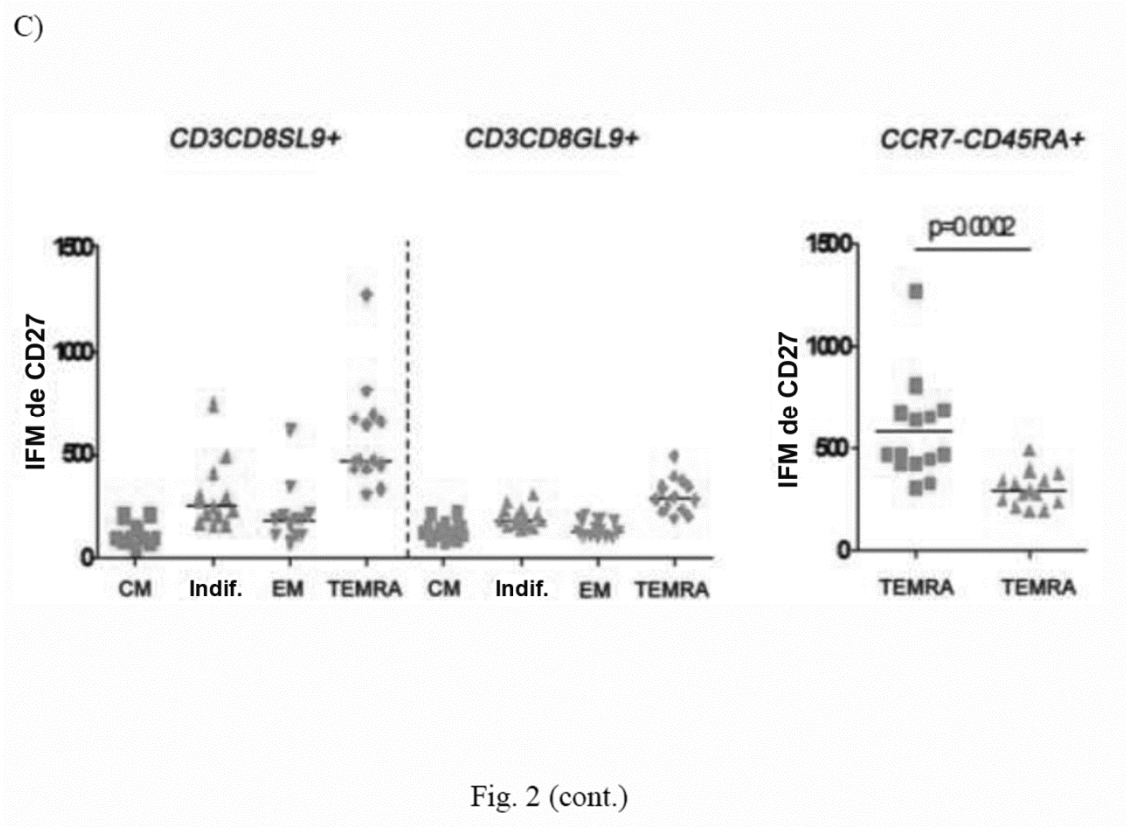
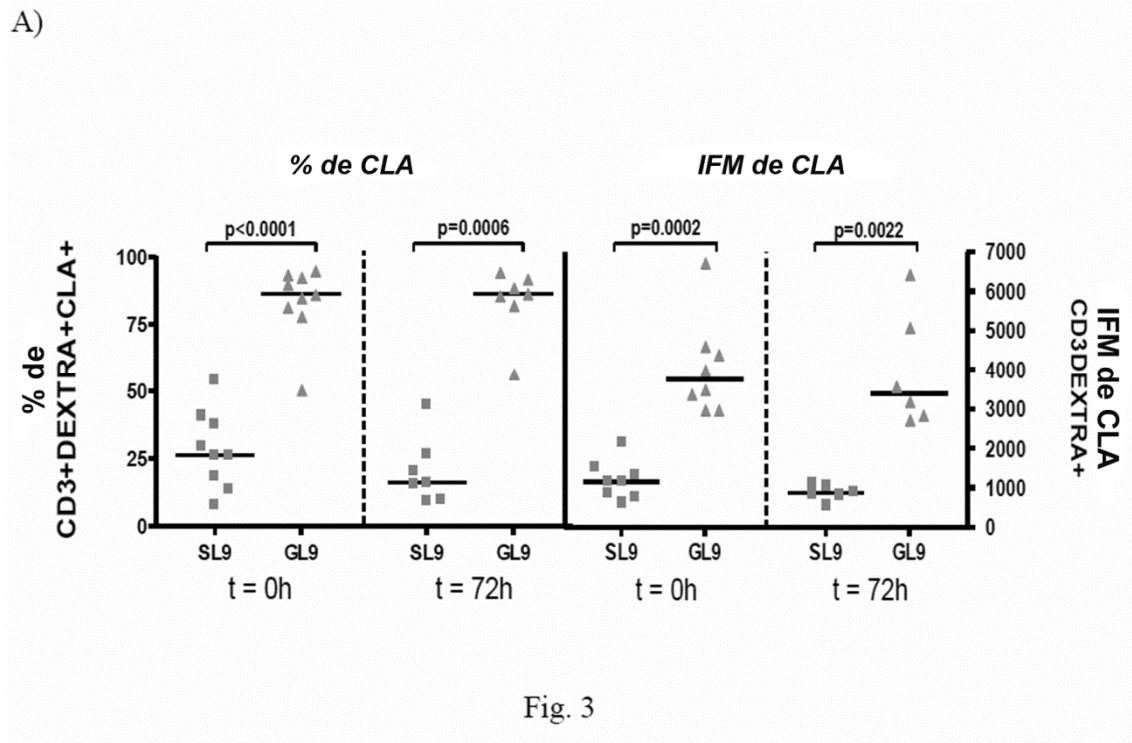


Fig. 1 (cont.)









B)

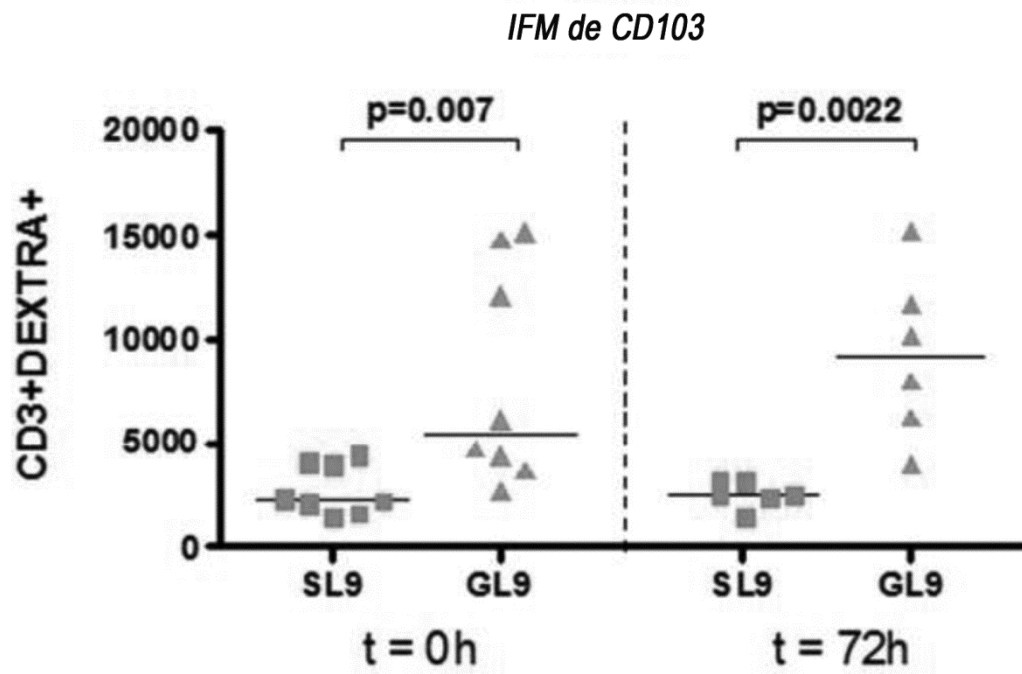


Fig. 3 (cont.)

C)

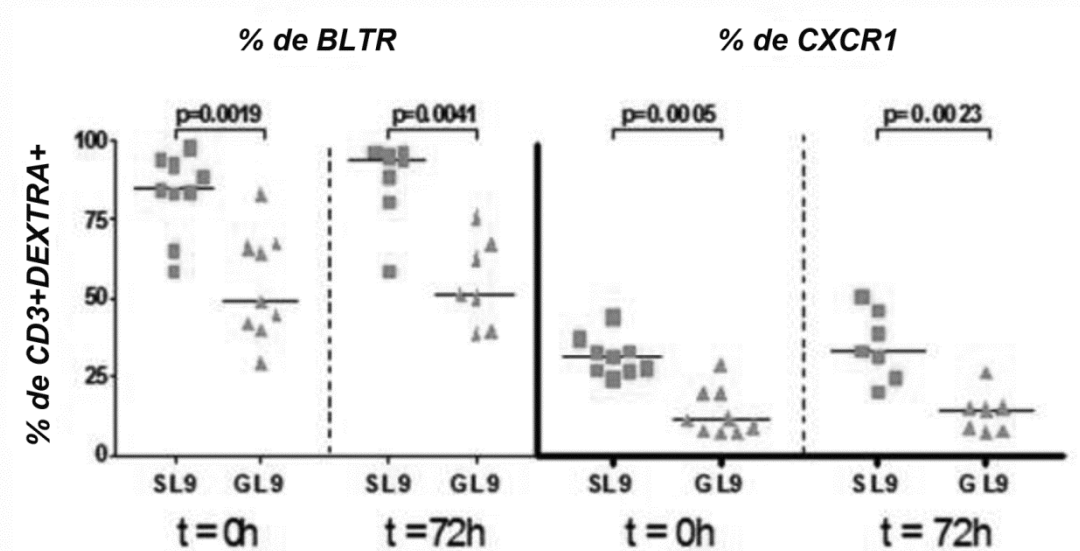


Fig. 3 (cont.)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.
Fundació Privada Institut de Recerca de Ia SIDA-Caixa
Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats

<120> Método para monitorizar las repuestas de linfocitos T citotóxicos
(LTC) mediante una reacción de hipersensibilidad de tipo
retardado (DTH) usando epítomos de LTC definidos

<130> P7625ESPC

<150> PCT/EP2012/067794
<151> 12-09-2012

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 1

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 2

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val
1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 3

ES 2 490 915 B1

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val
1 5 10

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 4

Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val
1 5

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 5

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
1 5 10

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 6

Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 7

Ala Leu Ser Thr Leu Cys Leu Leu Ile

1

5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
<400> 8

His Leu Glu Cys Arg Thr Phe Phe Leu
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
<400> 9

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
<400> 10

Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
<400> 11

Leu Gln Asn Ser Gln Val Phe Ser Leu
1 5

ES 2 490 915 B1

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 12

Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu Leu
 1 5

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 13

Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp His Val
 1 5 10

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 14

Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp His Val
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 15

Phe Leu Trp His Val Arg Lys Gln Val
 1 5

ES 2 490 915 B1

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 16

Ile Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 17

Phe Met Gln Ala Leu Gln Leu Leu Leu
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 18

Met Gln Ala Leu Gln Leu Leu Leu Glu Val
1 5 10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 19

Met Ile Thr Gln Phe Glu Ser Leu Lys
1 5

ES 2 490 915 B1

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 20

Phe Met Tyr Ser Asp Phe His Phe Ile
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 21

Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 22

Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile
 1 5

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe
 <400> 23

Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu Ser Ile
 1 5 10

<210> 24

ES 2 490 915 B1

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 24

Leu Leu Ala Trp Lys Gln Val Leu Ala
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 25

Tyr Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 26

Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 27

Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu
1 5

<210> 28
<211> 9

ES 2 490 915 B1

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 28

Arg Leu Ile Asp Phe Leu Lys Asp Val
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 29

Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 30

Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 31

Arg Met Phe Leu Ala Met Ile Thr Tyr Ile
1 5 10

<210> 32
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 32

Leu Leu Ile Asp Gly Thr Ala Ser Leu
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 33

Asn Met Leu Ser Thr Val Leu Gly Val
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 34

Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 35

Ala Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 36

Arg	Leu	Cys	Asn	Pro	Leu	Asn	Pro	Phe	Val
1				5					10

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 37

Leu	Gln	Asp	Cys	Lys	Ile	Ala	Pro	Leu
1				5				

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 38

Phe	Gln	Asn	Trp	Gly	Ile	Glu	His	Ile
1				5				

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 39

Phe	Gln	Asn	Trp	Gly	Ile	Glu	Pro	Ile
1				5				

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 490 915 B1

<220>

<223> Péptido restringido a HLA-A2 del virus de la gripe

<400> 40

Arg	Met	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Val
1				5				



- ②1 N.º solicitud: 201490028
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 12.09.2012
③2 Fecha de prioridad: **12-09-2011**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KRAN ANNE-MARTE B et al. "HLA- and dose-dependent immunogenicity of a peptide based HIV-1 immunotherapy candidate (Vacc-4x)" AIDS (Hagerstown) Septiembre 24, 2004 24.09.2004 VOL: 18 No: 14 Págs: 1875-1883 ISSN 0269-9370; todo el documento.	1,5-8,10,11, 15-18,20
Y	Todo el documento.	9,18
Y	FUHLBRIGGE ROBERT C et al. "Cutaneous lymphocyte-associated antigen is a specialized form of P-selection glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) expressed on skin-homing T cells" Arthritis and Rheumatism Sept., 1997 (09.1997) VOL: 40 No: 9 SUPPL. Págs: S74 ISSN 0004-3591; todo el documento.	9,18
X	WO 9850423 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT et al.) 12.11.1998, todo el documento.	1-8,10-18,20-22
X	WO 2009016639 A2 (BIONDVAX PHARMACEUTICALS LTD et al.) 05.02.2009, todo el documento.	1-8,10-14, 16-18,20-22
A	ASJÖ B et al. "Phase I trial of a therapeutic HIV type 1 vaccine, Vacc-4x, in HIV type 1-infected individuals with or without antiretroviral therapy" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, 20021210 MARY ANN LIEBERT, US 10.12.2002 VOL: 18 No: 18 Págs: 1357-1365 ISSN 0889-2229 Doi: doi:10.1089/088922202320935438; todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.12.2014

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K49/00 (2006.01)
A61K39/145 (2006.01)
A61K39/21 (2006.01)
C07K4/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP y bases de datos de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.12.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 2-4, 9, 12, 14, 19

SI

Reivindicaciones 1, 5-8, 10-11, 13, 16-18, 20-22

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1-22

NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KRAN ANNE-MARTE B et al. "HLA- and dose-dependent immunogenicity of a peptide based HIV-1 immunotherapy candidate (Vacc-4x)" AIDS (Hagerstown) Septiembre 24, 2004 24.09.2004 VOL: 18 No: 14 Págs: 1875-1883 ISSN 0269-9370.	24.09.2004
D02	FUHLBRIGGE ROBERT C et al. "Cutaneous lymphocyte-associated antigen is a specialized form of P-selection glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) expressed on skin-homing T cells" Arthritis and Rheumatism Sept., 1997 (09.1997) VOL: 40 No: 9 SUPPL. Págs: S74 ISSN 0004-3591.	31.08.1997
D03	WO 9850423 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT et al.)	12.11.1998
D04	WO 2009016639 A2 (BIONDVAX PHARMACEUTICALS LTD et al.)	05.02.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-22, es el uso de un péptido restringido a HLA- de un antígeno de un virus de la gripe o del HIV, para la fabricación de un producto de diagnóstico para determinar si un sujeto puede montar una respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) eficaz contra dicho virus. La determinación de dicha respuesta comprende determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (reiv. 1-10). Es también objeto de la invención, el uso de un péptido restringido a HLA-A2 de un antígeno de un virus de la gripe o del HIV, para la fabricación de un producto de diagnóstico para determinar una infección por dicho virus. La determinación de dicha infección comprende determinar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) (reiv. 11-20). Por último, es también objeto de la invención un péptido que comprende el epítipo restringido a HLA-A2 y un kit que comprende dicho péptido (reiv. 21 y 22).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes)

El documento D01 divulga un método para determinar si un sujeto puede montar una respuesta LTC frente al HIV-1, determinando si se produce una reacción DHT. Para la realización del método se utilizan antígenos peptídicos de HIV-1 que incorporan motivos HLA2 que son administrados de forma intradérmica (ver pág 1876, apartados "peptide design" y "delayed type hypersensitivity test").

Por lo tanto, las características técnicas de las reivindicaciones 1, 5-8 y 10 son ya conocidas del documento D01.

El documento D03 divulga un péptido HLA2 de un antígeno del virus de la gripe (denominado, antígeno M58-66), que corresponde con un péptido análogo al definido por la SEQ ID NO:1 de la presente solicitud de patente. Este documento también divulga un método de diagnóstico de la gripe mediante la determinación de una reacción de tipo DTH cuando se inyecta intradérmicamente una composición de diagnóstico que comprende péptidos de antígenos del virus de la gripe (derivados del péptido que corresponde con la SEQ ID NO:1 de la presente solicitud de patente) y un vehículo fisiológicamente aceptable.

Por lo tanto, las características técnicas de las reivindicaciones 1, 5-8, 10, 11, 13, 16-18 y 20 son ya conocidas del documento D03.

El documento D04 divulga vacunas frente a la gripe. Entre los péptidos antigénicos que divulga, se encuentra el que corresponde con la SEQ ID NO:1 de la presente solicitud de patente (SEQ ID NO: 38). Además, en este documento se divulga un método general para determinar la eficacia de dichos péptidos antigénicos HLA2 del virus de la gripe mediante la determinación de la reacción DTH en animales inmunizados.

Por lo tanto, las características técnicas de las reivindicaciones 1, 5-8, 21 y 22, son ya conocidas del documento D04.

En conclusión, y a la vista de los documentos D01, D03 y D04, las características técnicas de las reivindicaciones 1, 5-8, 10, 11, 13, 16-18 y 20-22 son ya conocidas en el estado de la técnica. En consecuencia, el objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1, 5-8, 10-11, 13, 16-18 y 20-22 no es nuevo en el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes y carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01, como se ha comentado anteriormente, divulga un método que permite conocer la respuesta LTC contra el VIH mediante la determinación de la reacción DHT en pacientes infectados, utilizando determinados antígenos peptídicos del virus. Para un experto en la materia sería obvio aplicar el mismo método (mediante la determinación de si se produce una reacción DTH) usando los mismos péptidos antigénicos, en una composición diagnóstica, para determinar si el sujeto padece una infección por dicho virus, es decir, para el diagnóstico del VIH.

Por lo tanto, las características técnicas de las reivindicaciones 11, 16-18 y 20, no implican actividad inventiva, ya que a falta de una ventaja técnica o un efecto técnico sorprendente, se considera que derivan directamente y sin equívoco de lo divulgado en el documento D01.

El documento D03, como ya se ha comentado anteriormente, divulga composiciones de diagnóstico que comprenden péptidos de antígenos del virus de la gripe (derivados del péptido que corresponde con la SEQ ID NO:1 de la presente solicitud de patente) y un vehículo fisiológicamente aceptable, para el diagnóstico de enfermedades que impliquen una respuesta LCT mediante la determinación de si se produce una reacción DTH (ver pág. 22 línea 35 a pág. 23 línea 3). Para un experto en la materia, y a falta de un efecto técnico sorprendente, sería obvio utilizar el péptido definido en la SEQ ID NO:1 en vez del péptido análogo M58-66.

Por lo tanto, las características técnicas de las reivindicaciones 1-8, 10-18 y 20-22 no implican actividad inventiva y se considera que derivan directamente y sin equívoco de lo divulgado en el documento D03.

De lo divulgado en el documento D04, se sabe que mediante la determinación de la reacción DTH se puede caracterizar la respuesta LCT frente al virus de la gripe en animales inmunizados, por lo que un experto en la materia consideraría aplicar dicho método para diagnosticar si un sujeto está afectado o no por el virus de la gripe. Del mismo modo, el experto en la materia utilizaría los péptidos divulgados en el documento D05 para elaborar una composición para el diagnóstico de infecciones por el virus de la gripe.

Por lo tanto, las características técnicas de las reivindicaciones 10-14, 16-18 y 20 no implican actividad inventiva y se considera que derivan directamente y sin equívoco de lo divulgado en el documento D04.

Por otra parte, partiendo de cualquiera de los documentos D01, D03 y D04, es conocido que la determinación de la reacción DTH es un método ampliamente conocido en el estado de la técnica, la determinación del aumento en el número de LCT específicos de epítipo CLA+, tal y como se explica en el documento D02, no implica actividad inventiva. Por lo tanto, las características técnicas de las reivindicaciones 9 y 19 no implican actividad inventiva.

En conclusión, y a la vista de los documentos D01, D02, D03 y D04, el objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 2-4, 9, 12, 14 y 19, aunque es nueva según el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.