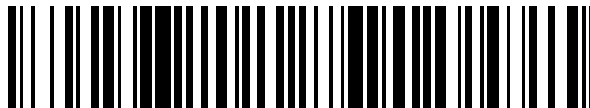


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 101**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2011 E 11710151 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2545380**

54 Título: **HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 para el pronóstico de trastornos neurológicos**

30 Prioridad:

**10.03.2010 EP 10290124**

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

**24.03.2015**

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)  
25-28 Rue du Docteur Roux  
75724 Paris Cedex 15, FR**

72 Inventor/es:

**GOUGEON, MARIE-LISE;  
POIRIER-BEAUDOIN, BÉATRICE;  
SEFFER, VALÉRIE y  
SAIDI, HÉLA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 532 101 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 para el pronóstico de trastornos neurológicos

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La solicitud se refiere a la cuantificación de la proteína HMGB1 o de los anticuerpos específicos para HMGB1 en una muestra biológica, en particular suero y Líquido Cefalorraquídeo (LCR) y su correlación respectiva con métodos de pronóstico del estado de progresión de trastornos neurológicos o hacia trastornos neurológicos, en particular trastornos neurológicos asociados con la infección por VIH y con métodos de diagnóstico. La solicitud también divulga la correlación de la proteína HMGB1 o de los anticuerpos específicos para HMGB1 con la supervisión de la infección por VIH o con la carga viral así como métodos de pronóstico del estado de progresión del SIDA y 15 trastornos neurológicos asociados con SIDA.

**Descripción de la técnica relacionada**

20 Poco después de la infección, el VIH-1 es capaz de penetrar en el cerebro, dando como resultado con el tiempo complicaciones asociadas con VIH en el sistema nervioso central (SNC). La demencia asociada con VIH (HAD) está caracterizada clínicamente por disfunciones motoras y conductuales que conducen a ataques, coma y muerte en un periodo de 6 meses después de la aparición. La encefalitis por VIH, el correlacionado patológico de HAD, se caracteriza por astrogliosis generalizada, tensión oxidativa, desregulación de citocinas/quimiocinas y degeneración neuronal (Gonzalez-Scarano y Martin-Garcia, Nat Rev Immunol 2005, 5: 69-81). Puesto que las neuronas no se ven 25 afectadas por VIH-1, la opinión actual es que estas células se dañan indirectamente por quimiocinas proinflamatorias liberadas por células gliales activadas. IP-10 (CXCL10) es una quimiocina neurotóxica que está regulada positivamente en astrogliosis y se ha sugerido que potencia la infección por retrovirus y media en la lesión neuronal. Se ha notificado la elevación de IP-10 en LCR en infección por VIH, y su nivel se ha correlacionado con la carga viral de VIH en LCR (Cinque P *et al.* J Neuroimmunol 2005, 168: 154). También se ha notificado una posible asociación 30 entre los niveles de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 LCR (MCP-1 o CCL2) y el desarrollo de HAD en una cohorte que ha experimentado HAART con infección por VIH avanzada (Sevigny JJ, Albert SM, McDermott MP; *et al.* Neurology. 2004; 63: 2084). Otro estudio presentó una asociación entre los niveles de MCP-1 en plasma y demencia asociada a VIH (Sevigny *et al.* Arch. Neurol. 2007, 64: 97).

35 La proteína de caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) es una proteína cromosómica no histona que actúa como una citocina proinflamatoria potente cuando se secreta de forma activa de macrófagos, monocitos, células dendríticas y otras células activadas tales como linfocitos NK. HMGB1 se comporta como un desencadenante de inflamación, atrayendo células inflamatorias y de reparación de tejido, reclutando células madre y promoviendo su proliferación. Además, HMGB1 activa células dendríticas (CD) y promueve su maduración funcional y su respuesta a 40 quimiocinas de ganglios linfáticos. Los leucocitos activados secretan de forma activa HMGB1 en el microambiente. De este modo HMGB1 actúa de una manera autocrina/paracrina y mantiene programas de reparación y defensa a largo plazo (Bianchi y Manfredi, 2007; Lotze y Tracey, 2005).

45 En recientes estudios, HMGB1 se ha identificado como biomarcador en enfermedad neurológica, por ejemplo esclerosis múltiple (Andersson *et al.*, Journal of Leukocyte Biology, 2008, 84, 1248-1255) se ha mostrado que HMGB1 desencadena replicación de VIH en CD infectadas por VIH, contribuyendo de este modo a la constitución de depósitos virales en CD (Saidi H, Melki M-T, Gougeon M-L, PLoS One 2008). Considerando que las CD son las primeras dianas para VIH en las primeras horas de infección de la mucosa, que después migrarán a órganos linfoides secundarios cuando transmitan VIH a linfocitos T, estos hallazgos plantean la cuestión de la implicación *in vivo* de HMGB1 en el desencadenamiento de la replicación viral y suministro de depósitos virales. Se produjo HMG1 50 durante una comunicación entre CD infectadas por VIH y linfocitos NK activados, dando como resultado también resistencia de CD infectadas por VIH a muerte por NK. La supervivencia de CD se asoció con la regulación positiva de dos inhibidores de apoptosis, c-IAP2 y c-FLIP en CD infectadas, un proceso inducido por HMGB1 (Melki M-T *et al.* PLoS Pathogens 2010, 6 (4) e1000862). El bloqueo de la actividad de HMGB1 por inhibidores específicos, tales como glicirricina o anticuerpos de bloqueo, anula la replicación de VIH en CD infectadas (Saidi H, Melki M-T, Gougeon M-L, PLoS One 2008) y restaura la susceptibilidad de CD infectadas a muerte por NK (Melki M-T *et al.* PLoS Pathogens 2010, 6 (4) e1000862). Estos hallazgos, que proporcionan nueva información sobre como el VIH secuestra las CD para promover la diseminación viral y mantener la viabilidad de depósitos a largo plazo, ha sido el objeto de la solicitud de patente PCT/EP2009/06828.

60 Estos hallazgos también plantean la cuestión de la implicación *in vivo* de HMGB1 en el desencadenamiento de replicación viral y suministro de depósitos virales. Para abordar esta cuestión, se ha cuantificado la concentración de HMGB1 en suero de pacientes infectados por VIH (Elisa, Shino test, IBL) para evaluar la contribución *in vivo* de HMGB1 en circulación a la carga viral de VIH en plasma y a la evolución de la enfermedad. Además, considerando 65 que pudieron encontrarse autoanticuerpos específicos para HMGB1 en enfermedades autoinmunes tales como SLE (lupus) (Hayashi *et al.*, 2009), se desarrolló un ensayo de Elisa específico para comprobar si se detectaron

anticuerpos específicos anti-HMGB1 en suero de pacientes infectados por VIH en enfermedad de VIH.

Se ha presentado la medida tanto de HMGB1 como de anticuerpos anti-HMGB1 en suero de pacientes en la solicitud de patente PCT/EP2009/06828. Se han extraído las siguientes conclusiones:

- 5 (i) la infección por VIH crónica desencadena la producción de HMGB1, detectado a niveles aumentados en suero de pacientes infectados, lo que a su vez induce la producción de anticuerpos neutralizantes;
- (ii) se detecta una correlación inversa entre HMGB1 y anticuerpos (Ab) anti-HMGB1, lo que indica que cuando HMGB1 se une a los anticuerpos, este ya no se detecta en muestras de suero;
- 10 (iii) cuantos más anticuerpos anti-HMGB1 (lo que quiere decir que se ha producido más HMGB1 anteriormente), menos linfocitos T CD4, lo que sugiere que los niveles aumentados de anticuerpos anti-HMGB1 en suero están asociados con la evolución de la enfermedad; y
- (iv) la terapia antirretroviral potente (HAART) reduce los niveles en suero tanto de HMGB1 como de anticuerpos anti-HMGB1 y puede normalizarlos por debajo de los niveles de la línea basal.

15 La solicitud de patente PCT/EP2009/06828 también ha planteado la hipótesis de que cuantos más anticuerpos anti-HMGB1 en suero, menor carga viral en suero. Sin embargo, esta hipótesis no se ha confirmado en un análisis exhaustivo de los experimentos realizados y en una cohorte mayor de pacientes. De hecho, se ha mostrado además que la correlación establecida entre anticuerpos anti-HMGB1 y la carga viral en suero divulgada en la patente PCT/EP2009/06828 derivaba de un análisis estadístico indebido de los resultados derivados de una cohorte de pacientes que abarcan tanto pacientes no tratados como pacientes tratados (tratamiento que tiene un efecto en la carga viral).

#### 25 Descripción de la invención

La solicitud aborda la cuestión de métodos basados en la cuantificación de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 para supervisar la infección por VIH y en algunos casos para supervisar la carga viral, y la invención aborda la cuestión de la posible implicación de HMGB1, anticuerpos anti-HMGB1 y quimiocinas en el método de pronóstico de la aparición trastornos neurológicos asociados con el SIDA o infección por VIH y en métodos de diagnóstico en un paciente infectado por VIH. Más en general, la invención se refiere además a métodos de pronóstico del estado de progresión de trastornos neurológicos o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos basándose en la cuantificación de HMGB1, anticuerpos anti HMGB1, y opcionalmente quimiocinas y a métodos de diagnóstico. Finalmente, la solicitud divulga un método de pronóstico *in vitro* del estado de progresión de una enfermedad o un trastorno en el que se ha mostrado que HMGB1 está implicado (por ejemplo, en el que el nivel de HMGB1 es mayor que el nivel de HMGB1 en un paciente sano o una población sano), basándose en la cuantificación de anticuerpos anti HMGB1, y opcionalmente quimiocinas.

40 HMGB1 es una proteína bien conocida que aparece en el núcleo y también se sabe que es una citocina. Las características funcionales y físicas de HMGB1 se divulgan en y se incorporan por referencia a Lotze, *et al.*, Nature Reviews, Immunology 5: 351 (2005).

Se conocen anticuerpos que se unen a HMGB1 y pueden producirse por métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de anticuerpos anti-HMGB1 disponibles en el mercado son anticuerpos policlonales primarios de Conejo para HMGB1 humana (Abcam ref. 18256) que se dirigen contra un péptido sintético conjugado con KLH derivado de los restos 150 al C terminal de HMGB1 humana. Estos métodos incluyen los que producen anticuerpos policlonales para HMGB1 y anticuerpos monoclonales para HMGB1 o para fragmentos específicos de HMGB1. Los anticuerpos usados en aplicaciones terapéuticas tienen la característica de ser bloqueantes, por ejemplo, especialmente interfieren con la replicación de VIH inducida por HMGB1 en células dendríticas infectadas. Estos anticuerpos derivan preferentemente de la misma especie que el sujeto al que se administran y reconocen o están inducidos para el HMGB1 de la misma especie a la que se administrarán. Estos anticuerpos pueden tener diferentes isotipos, tales como isotipos IgA, IgG o IgM. También pueden emplearse fragmentos de anticuerpos que se unen a HMGB1, incluyendo Fab, Fab<sub>2</sub> y anticuerpos de cadena sencilla o sus fragmentos.

55 La solicitud divulga un método *in vitro* para cuantificar anticuerpos, especialmente anticuerpos totales, específicos para HMGB1 contenida en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de un sujeto, que comprende (a) si los anticuerpos para cuantificar son anticuerpos totales, tratar la muestra de líquido cefalorraquídeo mediante un tratamiento ácido para disociar los complejos inmunes que implican HMGB1 hallada en la muestra, preferentemente con glicina 1,5 M a un pH bajo; (b) en cualquiera caso poner en contacto dicha muestra biológica, opcionalmente tratada, con proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma; y (c) cuantificar los anticuerpos, especialmente anticuerpos totales, específicos para HMGB1.

60 La expresión "*líquido cefalorraquídeo*" o "*LCR*" se refiere al líquido que ocupa el espacio subaracnoideo y el sistema ventricular alrededor y dentro del cerebro. El LCR ocupa el espacio entre la aracnoides y la piamadre. Constituye el contenido de todos los ventrículos intracerebrales, cisternas y surcos así como el canal central de la médula espinal. El LCR se obtiene habitualmente por punción lumbar.

En una realización preferida, el tratamiento ácido consiste en poner en contacto la muestra de líquido cefalorraquídeo con una solución de disociación ácida, que tenga un pH bajo, preferentemente entre pH 1 y 3, seleccionada para separar la proteína HMGB1 de anticuerpos a los que está unida de forma inmunológica en la muestra de líquido cefalorraquídeo, sin alterar la capacidad de unión de este anticuerpo. En una realización particular, la solución de disociación ácida es glicina (por ejemplo, 1,5 M) a un pH bajo, preferentemente entre pH 1 y 3 (por ejemplo 1,85). El tratamiento ácido se detiene después con un tampón de neutralización (tal como Tris, por ejemplo Tris 1,5 M, pH 9). En otra realización preferida, en combinación con la anterior o no, la incubación con la solución de disociación ácida se lleva a cabo a una temperatura entre 20 y 37 °C, preferentemente a 25 °C y/o la etapa de neutralización tiene lugar en hielo.

En la presente solicitud, el término “cuantificar” abarca el término “medir” y cualquier determinación informativa adecuada de la proteína HMGB1 o anticuerpos específicos.

Por “en circulación”, se entiende que los anticuerpos residuales hallados en la muestra, en particular en el suero o el LCR, es decir, los anticuerpos que se encuentran en una forma no en complejo (con la proteína HMGB). La expresión “en circulación” también se aplica a la proteína HMGB1 residual cuantificada sin tratamiento.

Por “total”, se entiende la suma o cantidad combinada de anticuerpos en circulación y anticuerpos en complejo inmunológico.

Todos los métodos divulgados en la presente solicitud e implementados en el LCR pueden llevarse a cabo por analogía, es decir de forma similar en otras muestras biológicas, y en particular en suero, sangre, plasma, saliva o tejido.

La solicitud divulga un método *in vitro* para supervisar la infección por VIH cuantificando los anticuerpos específicos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad I (HMGB1) especialmente anticuerpos totales específicos para HMGB1 contenidos en una muestra o muestras de líquido que son una muestra de suero o una muestra de líquido cefalorraquídeo o en ambas muestras obtenidas de un sujeto infectado con un VIH, que comprende:

- a) poner en contacto dicha muestra o muestras de líquido con la proteína HMGB1 o derivados de la misma; y
- b) cuantificar los anticuerpos específicos para HMGB1 donde la cantidad de anticuerpos anti-HMGB1 detectados se correlaciona con el pronóstico de la infección en particular donde dicha correlación es independiente de la carga viral en dicho sujeto.

La etapa de tratamiento divulgada en el presente documento para preparar los anticuerpos totales específicos para HMGB1 en la muestra del líquido cefalorraquídeo se aplica de forma similar para obtener dichos anticuerpos de la muestra de suero.

Los métodos son adecuados para supervisar la condición de un sujeto infectado con un VIH, especialmente VIH-1 o VIH-2.

En una realización particular, los métodos de la invención se implementan en un paciente infectado por VIH que se está sometiendo a terapia retroviral y/o es un paciente avirémico (es decir, 40 copias de ARN de VIH/ml de sangre). Un paciente infectado por VIH que está con terapia retroviral típicamente muestra una carga viral suprimida, una deficiencia inmunitaria moderada medida por recuentos de CD4 y recuentos de CD4 mínimos, y una activación inmunitaria moderada medida por linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan los marcadores de activación de CD38 y HLA-DR. Por ejemplo, un paciente infectado por VIH que muestra los parámetros clínicos del grupo de “todos los pacientes” como se describe en la Figura 14, y más particularmente en un paciente infectado por VIH que muestra una carga viral media de 1,6 copias log<sub>10</sub> de ARN de VIH/ml (es decir, paciente avirémico) y/o entre 300 y 800 linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, es típicamente un paciente infectado por VIH con terapia retroviral (HAART).

La “condición” del sujeto se refiere al estado clínico después de infección con un VIH o al riesgo de este sujeto para progresar hacia SIDA o a trastornos neurológicos asociados con VIH.

En una realización particular, el método *in vitro* se realiza en un sujeto que se sabe que está infectado con VIH, y comprende cuantificar los anticuerpos específicos para caja de grupo de alta movilidad I (HMGB1) contenida en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de este sujeto, donde los anticuerpos a los que se dirige la cuantificación son los anticuerpos totales específicos para HMGB1 o su fracción en circulación (anticuerpos en circulación) o su fracción en complejo inmunológico.

Los métodos para supervisar la infección por VIH, para evaluar la deficiencia inmunitaria o para determinar el nivel de activación inmunitaria así como el pronóstico y/o los métodos de diagnóstico de divulgados en el presente documento incluyendo cuando dicho método se realiza con una determinación paralela de la carga viral, pueden basarse en la cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1 (anticuerpos residuales), o en la cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1 o en la cuantificación de la fracción de complejo de anticuerpos específicos / HMGB1 inmunológico.

Los métodos para evaluar la deficiencia inmunitaria o para determinar el nivel de activación inmunitaria así como los métodos de pronóstico y/o diagnóstico divulgados en el presente documento se basan en la cuantificación de anticuerpos específicos para HMGB1, en una muestra tal como una muestra LCR y/o muestra de suero. Para algunos de estos métodos, tales como métodos de diagnóstico, pueden ser apropiadas o requerirse etapas adicionales para alcanzar un resultado de diagnóstico.

En el método *in vitro* para cuantificar anticuerpos específicos para HMGB1, el método *in vitro* para controlar la infección por VIH, métodos para evaluar la deficiencia inmunitaria o para determinar el nivel de activación inmunitaria como se describe en el presente documento, así como métodos de pronóstico y/o diagnóstico de la infección, los anticuerpos cuantificados específicos para HMGB1 de un paciente pueden compararse con la cantidad de anticuerpos específicos para HMGB1 determinados a partir de una población sana (por ejemplo, no infectada con VIH), de una población de sujetos (enfermos o no) sin trastornos neurológicos observados (por ejemplo, una población de pacientes infectados por VIH sin HAND) o de una población de pacientes enfermos clasificados en un estadio particular de progresión de esta enfermedad (por ejemplo estadios 1 a 4 de pacientes infectados con VIH). Los anticuerpos cuantificados específicos para HMGB1 de un paciente también pueden compararse con la capacidad de anticuerpos específicos para HMGB1 determinados en el mismo paciente, en un momento diferente, o en momentos diferentes; en este último caso, la relación de los valores de cuantificación obtenida puede calcularse y puede determinarse la evolución de la cantidad de anticuerpos específicos para HMGB1. En la misma etapa de comparación también puede aplicarse para la cuantificación de quimiocinas, tales como IP-10 y/o MCP-1.

En una realización particular, todos estos métodos se basan en (abarcen) la cuantificación de anticuerpos específicos en circulación, llamados residuales, o de anticuerpos específicos totales.

Puede preferirse la cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1.

Cuando la cuantificación se basa en los anticuerpos totales específicos para HMGB1, los métodos de la invención también comprenden una etapa adecuada para disociación de complejos inmunológicos formados con anticuerpos específicos de HMGB1 y por ejemplo los métodos de la invención usan o incluyen el método de cuantificación basado en el tratamiento ácido como se ha divulgado anteriormente y en particular el divulgado en los ejemplos. Cuando la cuantificación se basa en los anticuerpos en circulación específicos para HMGB1, no se requiere dicha etapa de disociación.

En una realización particular, dicha cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo (obtenida de un sujeto) con la proteína de caja de grupo de Alta movilidad I (HMGB1) o derivados de la misma. El contacto de la muestra de líquido cefalorraquídeo con dicha proteína así como la cuantificación de los complejos formados se lleva a cabo *in vitro*.

En una realización particular, dicha cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra de suero (obtenida de un sujeto) con la proteína de la caja del grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) o derivados de la misma. El contacto de la muestra de suero con dicha proteína así como la cuantificación de los complejos formados se llevan a cabo *in vitro*.

Se entiende que en los métodos diseñados para supervisar la infección por VIH, en particular cuando se acompañan de la determinación de la carga viral, para evaluar la deficiencia inmunitaria y para determinar el nivel de activación inmunitaria como se divulga en el presente documento así como los métodos de pronóstico y/o diagnóstico de la infección, es posible usar la secuencia de la proteína HMGB1 de longitud completa (de origen mamífero, preferentemente de origen humano tal como la definida con el Número de Referencia NP\_002119) o cualquier péptido (de 10 a 30 restos de aminoácidos) o polipéptido (de 30 a 215 restos de aminoácidos, preferentemente de 30 a 50, de 30 a 100, o de 30 a 150 restos) derivado de HMGB1 (derivados de proteínas HMGB1) siempre que estos derivados se unan a anticuerpos específicos para HMGB1 y/o permitan cuantificar los anticuerpos anti-HMGB1. Dichos derivados se seleccionan en el grupo que consiste en un HMGB1 recombinante (por ejemplo la proteína comercializada como HMG biotech HM-115), una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1, una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1 cuya secuencia es común a proteínas HMGB1 de diversos orígenes. La BOXB recombinante de HMGB1 que corresponde a la secuencia de HMGB1 común para ser humano y ratón (HMGbiotech HM-051) es uno de dichos ejemplos.

Por "*paciente infectado por VIH*" o "*un sujeto que se sabe que está infectado con VIH*" se entiende un sujeto o paciente que se ha diagnosticado de forma precisa y concluyente con respecto a un virus VIH, y para quien se ha confirmado infección por VIH después de ensayos relevantes. Los pacientes infectados por VIH pueden clasificarse de acuerdo con varios parámetros tales como carga viral, número de linfocitos T CD4 o síntomas clínicos de SIDA.

En pacientes que padecen trastornos neurológicos, una clasificación particular se basa en esos trastornos neurológicos asociados con infección por VIH, como se determina por los especialistas clínicos, como sigue:

- 65 - Estadio 1, con ensayos NP (Neurofisiológicos) normales
- Estadio 2, con al menos 2 DT (desviaciones típicas) por debajo de la media en un ensayo cognitivo o al menos

una DT por debajo de la media en más de 1 ensayo que explore el mismo dominio. Estos resultados definen la condición de ND (déficit neuropsicológico).

- Estadio 3, que incluye pacientes con criterios para ANI (deterioro neurocognitivo asintomático).
- Estadio 4, que incluye pacientes con MCD (trastorno neurocognitivo menor).

5 Esta clasificación puede ligarse a la clasificación propuesta por Antinori *et al.* (Neurology. 30 Oct 2007; 69(18):1789-99) de la siguiente manera: los pacientes sin HAND (trastornos neurológicos asociados con VIH) incluyen estadio 1 y estadio 2, mientras que los pacientes con HAND incluyen estadio 3 y estadio 4.

10 Como se ha divulgado anteriormente la detección o supervisión de infección por VIH realizando detección o cuantificación de HMGB1 o de anticuerpos anti-HMGB1 en muestras de suero puede acompañarse de determinación de carga viral mediante técnicas bien conocidas.

15 Como se describe en el presente documento, la determinación de dicha carga viral puede conseguirse realizando los métodos de la invención en sí mismos, especialmente cuando los pacientes diagnosticados no se tratan para infección por VIH.

20 La presente solicitud divulga un método para supervisar la carga viral de VIH de un sujeto que se sabe que está infectado con VIH, que comprende llevar a cabo el método de cuantificación de los anticuerpos totales específicos para HMGB1, en una muestra, en particular en una muestra de suero o en una de líquido cefalorraquídeo, donde cuantos más anticuerpos específicos para HMGB1, mayor la carga viral. Este enfoque para supervisar la carga viral (VL) sería relevante en un paciente que se sabe que está infectado con VIH y no está tratado para esta infección en el momento de la supervisión de la carga viral, o en pacientes cuya VL no está controlada.

25 Por "*carga viral*" se entiende el ARN de VIH (que deriva de partículas virales y está presente en plasma) o el ADN de VIH (que está integrado en el genoma celular y presente en células). Los métodos de la invención basados en la cuantificación de anticuerpos específicos para HMGB1 son adecuados para supervisar la carga viral de ARN de VIH.

30 Por "*supervisar la infección por VIH*", se entiende el seguimiento de la infección por VIH en el tiempo. La infección por VIH puede evaluarse por diversos parámetros tales como la medición de la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4 y/o parámetros clínicos asociados con la evolución de la enfermedad. La progresión de la infección por VIH, es decir, la reducción, el aumento o la estabilidad de parámetros medidos, en comparación con un ensayo previo, dictará el modo de cuidar al paciente. La progresión de la infección por VIH refleja la replicación de VIH y/o la integración del genoma de VIH en el genoma de células diana.

35 La solicitud divulga un método de pronóstico *in vitro* del estado de progresión del síndrome de inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o el estado de progresión hacia SIDA, de un paciente infectado con VIH, o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos asociados con infección por VIH, que comprende llevar a cabo el método de cuantificación o el método para supervisar la infección por VIH divulgada anteriormente, en una muestra, en particular en una muestra de suero o de líquido cefalorraquídeo, obtenida de un paciente después de infección por VIH, y preferentemente durante la infección primaria o aguda, o durante la infección crónica o donde cuanto mayor sea el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1, mayor será el riesgo de desarrollar SIDA o un estado avanzado de SIDA y en particular mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos asociados con infección por VIH.

45 La invención también se refiere a un método de pronóstico *in vitro* del estado de la progresión de trastornos neurológicos o el estado de la progresión a trastornos neurológicos, que comprende:

- 50 a) poner en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de suero o tanto una muestra de suero como una muestra de líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho paciente, con proteína HMGB1 nativa o derivados de proteínas HMGB1 siempre que estos derivados se unan con anticuerpos específicos para HMGB1; y
- b) cuantificar los anticuerpos específicos para la caja del grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) contenidos en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo, dicha muestra de suero o tanto dicha muestra de suero como dicha muestra de líquido cefalorraquídeo

55 donde cuanto mayor sea el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1, mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos o de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos.

60 En una realización particular, cuando dichos trastornos neurológicos resultan o se sospecha que resultan de una infección (por un patógeno, bacteria o virus), la muestra se obtiene durante infección primaria o aguda o durante infección crónica.

65 El término "pronóstico" se refiere a la posibilidad de evaluar, en un momento en que se lleva a cabo la cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 en una muestra obtenida de un paciente, el riesgo de que el paciente desarrolle o progrese hacia trastornos neurológicos, o en un paciente infectado por VIH, el riesgo de desarrollar

SIDA o progresar hacia SIDA.

La invención también se refiere a métodos de diagnóstico que combinan (1) la evaluación en un paciente de la presencia de trastornos neurológicos, o en un paciente infectado por VIH, la presencia de trastornos neurológicos asociados con SIDA, por criterios clínicos convencionales; y (2) la confirmación o la correlación de la aparición de estos trastornos neurológicos por la determinación de parámetros inmunológicos, en particular la cuantificación de anticuerpos específicos contra HMGB1 (y opcionalmente la cuantificación de quimiocinas tales como IP-10 y/o MCP-1), combinados opcionalmente con la determinación de cambios volumétricos y/o metabólicos. La cuantificación de anticuerpos de HMGB1 específicos se lleva a cabo como se describe en la presente solicitud para los métodos de pronóstico. Por lo tanto, el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1 puede correlacionarse con la observación de criterios clínicos convencionales para confirmar el diagnóstico clínico. Los términos “diagnóstico” y “diagnosis” se refieren a la posibilidad de determinar para un paciente, en el momento en que se lleva a cabo la cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 en una muestra obtenida de este paciente, la presencia o la ausencia de trastornos neurológicos, o en un paciente infectado por VIH, la presencia o la ausencia de trastornos neurológicos asociados con SIDA, basándose tanto en criterios clínicos convencionales como en parámetros inmunológicos. La cuantificación de anticuerpos específicos para HMGB1 en el trascurso de métodos de diagnóstico, es particularmente apropiada en pacientes en los que los criterios clínicos convencionales no permiten concluir con certeza la aparición de trastornos neurológicos. Por ejemplo, en pacientes infectados por VIH clasificados en el estadio 2 (déficit neuropsicológico), la cuantificación de anticuerpos específicos de HMGB1 puede ser un indicador complementario eficaz para confirmar, informar o cualificar el diagnóstico de trastornos neurológicos obtenido con los criterios clínicos convencionales.

En una realización particular, el presente método de pronóstico *in vitro* y/o método de diagnóstico son en general aplicables a enfermedades o trastornos en los que se muestra que HMGB1 está implicada y asociada con un riesgo o afección patológico.

Por lo tanto, los métodos de la invención pueden implementarse:

(1) en enfermedades o trastornos en los que estén presentes trastornos neurológicos, sea cual sea su origen. Esta categoría incluye, pero sin limitación, las enfermedades o trastornos de origen infeccioso, por ejemplo, infección bacteriana, infección patógena, infección viral o infección por prion. Un ejemplo particular de trastorno infeccioso con trastornos neurológicos es la infección por VIH. Esta categoría también incluye, pero sin limitación, enfermedades o trastornos cuyo origen no es infeccioso (por ejemplo, es de un origen traumático) o cuyo origen es desconocido, por ejemplo, lesión neuronal aguda, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, lesión cerebral postisquémica, enfermedad de Parkinson, cualquier trastorno que afecte al sistema nervioso periférico y/o la médula espinal, tal como lesión de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades desmielinizantes tales como esclerosis múltiple (EM).

Por “trastornos neurológicos”, se entiende por ejemplo complejo de demencia (ADC), encefalopatía, linfomas del sistema nervioso central, meningitis criptocócica, encefalitis por citomegalovirus (CMV), encefalitis y mielitis provocadas por el virus del herpes zoster, neuropatía (neuropatía periférica y polineuropatía sensorial distal), neurosífilis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), encefalitis por toxoplasma o toxoplasmosis cerebral y mielopatía vacuolar.

Los métodos descritos en el presente documento pueden implementarse:

(2) en enfermedades o trastornos sin trastornos neurológicos, en los que se ha mostrado que está implicada la proteína HMGB1 cuyo origen es infeccioso (bacterias, patógenos o virus), o es autoinmunitario. Los ejemplos de enfermedades de esta segunda categoría abarcan, pero sin limitación, diabetes de tipo 1, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, infección por VHS-2, hepatitis crónica B, infección por *Legionella*, septicemia, o asma.

Más particularmente, la invención se refiere a un método de pronóstico *in vitro* del estado de progresión de trastornos neurológicos asociados con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos asociados con infección por VIH o con SIDA, de un paciente infectado por VIH, que comprende llevar a cabo el método de cuantificación o el método para supervisar la infección por VIH divulgado anteriormente, en una muestra, en particular en una muestra de suero o en una de líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho paciente después de la infección, y preferentemente durante la infección primaria o aguda o durante la infección crónica, y donde cuanto mayor sea el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1, mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos asociados con SIDA o desarrollar trastornos neurológicos avanzados asociados con SIDA o trastornos neurológicos de un estadio avanzado de SIDA.

La expresión “estado de progresión de SIDA o hacia SIDA” se refiere a los diversos estadios que se encuentran en la progresión del SIDA o hacia SIDA, y en particular se refiere al sistema de estadificación de enfermedad de la OMS para infección por VIH y enfermedad producido y actualizado por la Organización Mundial de la Salud, que se resume a continuación en el presente documento. Estadio I: la enfermedad de VIH es asintomática y no se clasifica como SIDA; el Estadio II incluye manifestaciones mucocutáneas menores e infecciones del tracto respiratorio superior recurrentes; el Estadio III incluye diarrea crónica inexplicable durante más de un mes, infecciones bacterianas graves y tuberculosis pulmonar; y el Estadio IV incluye toxoplasmosis del cerebro, candidiasis del

esófago, tráquea, bronquios o pulmones y sarcoma de Kaposi.

La expresión "estado de progresión hacia trastornos neurológicos", cuando se aplica a un paciente infectado por VIH se refiere a la clasificación de estadios de trastornos neurológicos (de 1 a 4) como se ha descrito anteriormente.

5 Como alternativa, también puede considerarse la clasificación propuesta por Antinori *et al.* y que se refiere a pacientes sin HAND (trastornos neurológicos asociados con VIH) y con HAND.

La expresión "*trastornos neurológicos asociados con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida*" o "*trastornos neurológicos asociados con SIDA*" o "*trastornos neurológicos asociados con infección por VIH*" abarcan trastornos neurológicos del sistema nervioso que están provocados directamente por el virus VIH, por ciertos cánceres y/o infecciones oportunistas, así como trastornos de origen desconocido que se ven influidos por pero no se conoce que están causados directamente por el virus. Algunos de estos trastornos neurológicos asociados con SIDA pueden ser característicos del estado de progresión de la enfermedad, como se ha definido anteriormente. Son ejemplos de trastornos neurológicos asociados con SIDA el complejo de demencia de SIDA (ADC) o encefalopatía asociada con VIH, linfomas del sistema nervioso central, meningitis criptocócica, encefalitis por citomegalovirus (CMV), encefalitis y mielitis provocadas por el virus del herpes zóster, neuropatía (neuropatía periférica y polineuropatía sensorial distal), neurosífilis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), encefalitis por toxoplasma o toxoplasmosis cerebral y mielopatía vacuolar. Algunos pacientes con carga viral (VL) controlada que no están en el estadio de SIDA, como por ejemplo pacientes sometidos a terapia antirretroviral potente (HAART), pueden desarrollar trastornos neurológicos. Se ha divulgado anteriormente una clasificación clínica con respecto a estos trastornos neurológicos.

En una realización preferida de la presente invención, el método de pronóstico *in vitro* del estado de progresión de trastornos neurológicos asociados con infección por VIH o con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos asociados con infección por VIH o con SIDA se realiza en una muestra o muestras biológicas de un paciente con carga viral controlada (VL) que no está en el estadio del SIDA, como por ejemplo un paciente con terapia antirretroviral potente (HAART).

La solicitud divulga un método *in vitro* para evaluar la deficiencia inmunitaria (o inmunodeficiencia) de un paciente, en particular un sujeto que se sabe que está infectado con VIH que comprende llevar a cabo el método de cuantificación o el método de supervisión de infección por VIH divulgado anteriormente, en una muestra, en particular en una muestra de suero o en una de líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho sujeto, donde cuantos más sean los anticuerpos específicos para HMGB1, mayor será la deficiencia inmunitaria. Con respecto al paciente infectado por VIH, la inmunodeficiencia observada después de infección es el resultado de la reducción de los linfocitos T CD4, lo que se ha mostrado en la presente invención que se correlaciona de forma negativa con el nivel de anticuerpos anti HMGB1 específicos.

Como se describe en el presente documento, también es parte de la presente invención un método *in vitro* para determinar el nivel de activación inmunitaria especialmente activación inmunitaria persistente o activación inmunitaria persistente en algún compartimento o algunos compartimentos del cuerpo, induciendo especialmente estado inflamatorio persistente en un paciente, en particular un sujeto que se sabe que está infectado con VIH que comprende llevar a cabo el método de cuantificación divulgado anteriormente, en una muestra, en particular en una muestra de suero o en una de líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho sujeto, donde cuantos más sean los anticuerpos específicos para HMGB1, más persistente será la activación inmunitaria. La activación inmunitaria persistente (o crónica) está asociada con una alta expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD8, en particular marcadores CD38 y/o HLA-DR. Por lo tanto, la presente invención ha demostrado que un alto nivel de anticuerpos específicos de HMGB1 se correlaciona con alto nivel tanto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> como de linfocitos T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>.

La activación inmunitaria en particular se refiere a activación inmunitaria observada en pacientes en fase aguda de infección por VIH, o a activación inmunitaria observada en pacientes con infección por VIH crónica, especialmente cuando dicho paciente no está en tratamiento antirretroviral (ART) o presenta trastornos neurológicos asociados con infección por VIH.

Dentro de los métodos de pronóstico y/o diagnóstico *in vitro*, para evaluar la deficiencia inmunitaria o para determinar el nivel de activación inmunitaria, el método de cuantificación es, por ejemplo, un método que comprende:

- a) poner en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo o muestra de suero, o tanto una muestra de suero como una muestra del líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho paciente, y preferentemente durante la infección primaria o aguda, o durante la infección crónica, con proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma; y
- b) cuantificar los anticuerpos específicos para la caja del grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) contenida en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo, dicha muestra de suero, o tanto dicha muestra de suero como muestra de líquido cefalorraquídeo.



Como se describe en el presente documento, los métodos para evaluar la deficiencia inmunitaria o para determinar el nivel de activación inmunitaria basándose en la cuantificación de anticuerpos anti-HMGB1, un aumento del nivel de anticuerpos anti-HMGB1 de más del 20 % en comparación con el nivel del nivel de anticuerpos anti-HMGB1 en una población sana o en una población de pacientes infectados por VIH sin HAND se correlaciona con una  
 5 activación inmunitaria persistente, un mayor riesgo de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos y/o una mayor deficiencia inmunitaria.

Los métodos de la invención también pueden comprender, antes de la etapa a), una etapa adecuada para la disociación de complejos inmunológicos formados con anticuerpos específicos de HMGB1, de modo que se  
 10 cuantifiquen los anticuerpos anti-HMGB1 específicos totales. Por ejemplo, esta etapa adicional incluye un tratamiento ácido, tal como la desvelada en los ejemplos. En una realización particular, este tratamiento ácido consiste en poner en contacto la muestra o las muestras (líquido cefalorraquídeo, suero o ambos) con una solución de disociación ácida, que tiene un pH bajo, preferentemente entre pH 1 y 3, elegida para separar la proteína HMGB1 de anticuerpos con los que está unida inmunológicamente en la muestra, sin alterar la capacidad de unión de este  
 15 anticuerpo. En una realización particular, la solución de disociación ácida es glicina (por ejemplo 1,5 M) a un pH bajo, preferentemente entre pH 1 y 3 (por ejemplo, 1,85). El tratamiento ácido se detiene después con un tampón de neutralización (tal como Tris, por ejemplo Tris 1,5 M, pH 9). El tratamiento ácido conduce a una dilución de la muestra biológica (LCR, suero, etc.). En otra realización preferida, en combinación con la anterior o no, la incubación con la solución de disociación ácida se lleva a cabo a una temperatura entre 20 y 37 °C, preferentemente a 25 °C y/o  
 20 la etapa de neutralización tiene lugar en hielo.

En una realización particular, dicha cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 se lleva a cabo poniendo en contacto *in vitro* una muestra con la proteína de caja del grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) o derivados de la misma. Por lo tanto, dicha cuantificación se lleva a cabo usando la secuencia de la proteína HMGB1  
 25 de longitud completa (origen mamífero, preferentemente origen humano tal como la definida con número de referencia NP\_002119) o cualquier péptido (de 10 a 30 restos de aminoácidos), o polipéptido (de 30 a 215 restos de aminoácidos, preferentemente de 30 a 50, o de 30 a 100, o de 30 a 150 restos) derivados de HMGB1 (derivados de proteína en HMGB1) siempre que estos derivados se unan con anticuerpos específicos para HMGB1 y/o permitan cuantificar los anticuerpos anti-HMGB1. Dichos derivados se seleccionan del grupo que consiste en un HMGB1  
 30 recombinante (por ejemplo la proteína comercializada como HMGBiotech HM-115), una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1, una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1 cuya secuencia es común con proteínas HMGB1 de diversos orígenes. Un ejemplo de estas es la BOXB recombinante de HMGB1 correspondiente a la secuencia común a HMGB1 humana y de ratón (HMGBiotech HM-051).

Todos y cada uno de los métodos *in vitro* divulgados en la presente solicitud comprenden además opcionalmente la cuantificación de otras moléculas halladas en la muestra (tal como la muestra de suero o la de líquido cefalorraquídeo) y en particular de quimiocinas. Son ejemplos de quimiocinas que pueden, de forma independiente, ensayarse y cuantificarse, la quimiocina IP-10 y la quimiocina MCP-1. La quimiocina humana IP-10 (proteína inducida por interferón gamma de 10 kDa) también se llama ligando de Quimiocina (motivo C-X-C) 10 o CXCL10, y  
 40 se cita en el Número de Referencia de NCBI NP\_001556); la quimiocina humana MCP-1 (por proteína quimiotáctica de monocitos 1) también se llama ligando de Quimiocina (motivo C-C) 2 (CCL2) y se cita en el Número de Referencia de NCBI NP\_002973).

Cuando se aplica a las moléculas y en particular a las quimiocinas tales como la quimiocina IP-10 y la quimiocina  
 45 MCP-1, el término “cuantificar” o “cuantificación” abarca el término “medir” y cualquier determinación informativa adecuada del nivel de quimiocina IP-10 y quimiocina MCP-1.

La solicitud divulga un método *in vitro* para supervisar el estado de un sujeto que se sabe que está infectado con VIH, que comprende llevar a cabo el método de cuantificación divulgado en el presente documento (cuantificación de anticuerpos específicos para HMGB1) y una etapa para cuantificar la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1,  
 50 en una muestra, en particular en una muestra de suero o en una de líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho sujeto.

En otra realización, la invención también se refiere a un método *in vitro* para pronosticar el estado de progresión de trastornos neurológicos o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos o un método de diagnóstico, que comprende llevar a cabo, en una muestra, en particular en una muestra de suero o en una de líquido cefalorraquídeo, o ambas, obtenidas de un paciente, el método de cuantificación desvelado del presente documento y etapas para cuantificar la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1, y donde cuanto mayor sea el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1 y mayor la quimiocina IP-10 y/o mayor la quimiocina MCP-1, mayor será el  
 60 riesgo de desarrollar trastornos neurológicos o de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos.

Además, la invención también se refiere a un método *in vitro* para pronosticar el estado de progresión de trastornos neurológicos asociados con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o con infección por VIH en general o  
 65 el estado de progresión hacia trastornos neurológicos asociados con SIDA o con infección por VIH en general, de un paciente infectado con VIH, que comprende llevar a cabo, en una muestra, en particular en una muestra de suero o

en una de líquido cefalorraquídeo, obtenidas de un paciente después de infección, el método de cuantificación divulgado en el presente documento (cuantificación de anticuerpos específicos para HMGB1) y etapas para cuantificar la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1, y donde cuanto mayor sea el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1 y más quimiocinas IP-10 y/o más quimiocinas MCP-1, mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos asociados con SIDA o con infección por VIH en general o de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos asociados con SIDA o con infección por VIH en general.

Para todos los métodos de pronóstico como se describen en el presente documento, se realizan particularmente etapas para cuantificar la quimiocina o las quimiocinas al mismo tiempo que la etapa para cuantificar los anticuerpos específicos para HMGB1.

La solicitud también desvela un método que comprende la cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 (por ejemplo como se ha descrito anteriormente), en la muestra de líquido cefalorraquídeo y en la muestra de suero de un individuo infectado por VIH, llevándose a cabo ambas cuantificaciones en el mismo individuo y en muestras tomadas a la vez, y, opcionalmente, la cuantificación de la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1, ambas en la muestra de líquido cefalorraquídeo y la muestra de suero del mismo individuo y tomándose dichas muestras al mismo tiempo.

Este método, basado en la cuantificación paralela de los anticuerpos específicos para HMGB1 en dos muestras diferentes puede usarse en las siguientes aplicaciones:

- un método de pronóstico *in vitro* para el estado de progresión de trastornos neurológicos o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos, de un paciente;
- un método de pronóstico *in vitro* para el estado de progresión de trastornos neurológicos asociados con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o con infección por VIH o en estado de progresión hacia trastornos neurológicos asociados con SIDA o con infección por VIH, de un paciente infectado con VIH, durante la infección primaria o aguda o durante la infección crónica; y
- cuando se asocia con otros medios, en un método de diagnóstico para el estado de progresión de trastornos neurológicos o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos en un paciente, en particular para el estado de progresión de trastornos neurológicos asociados con SIDA o con infección por VIH o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos asociados con SIDA o con infección por VIH, en un paciente infectado con VIH.

Por "*al mismo tiempo*", se entiende que las muestras se obtienen de un paciente determinado, dentro de un periodo de tiempo en el que los síntomas clínicos, en particular los trastornos neurológicos, tales como los trastornos neurológicos asociados con SIDA o VIH, el estadio de SIDA y/o la carga viral de suero o LCR de dichos pacientes infectados por VIH son similares (estadísticamente no significativos) o idénticos. En particular, este periodo no excede (es menor de) 6 meses, 3 meses, 1 mes o dos semanas.

En paralelo con todos y cada uno de los métodos de pronóstico y/o diagnóstico *in vitro*, el método *in vitro* para evaluar la deficiencia inmunitaria, la supervisión *in vitro* de la condición de un paciente, el método *in vitro* para determinar el nivel de activación inmunitaria y el método de cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 en la muestra de líquido cefalorraquídeo y en la muestra de suero como se ha divulgado anteriormente, se determina la carga viral de VIH usando un método convencional (por ejemplo por PCR). La expresión "*en paralelo*" significa que los métodos se llevan a cabo en muestras obtenidas del mismo paciente al mismo tiempo.

Resulta interesante que, aunque la carga viral en suero y/o LCR de un paciente puede ser indetectable y revela ausencia de replicación del virus VIH en sangre y/o SNC, la cuantificación de una cantidad de anticuerpos específicos para HMGB1, posiblemente junto con gran cantidad de la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1, revela que el virus VIH se replica en otros compartimentos u órganos tales como hígado, cerebro o intestino. Esto puede explicar que los pacientes infectados por VIH tratados que tienen carga viral de VIH baja o indetectable de acuerdo con los patrones conocidos no progresen hacia SIDA presentando a la vez trastornos neurológicos. Esta observación justifica que, en paralelo con la determinación de la carga viral del suero, otros ensayos, tales como la cuantificación de anticuerpos específicos para HMGB1 pueden implementarse para tener en cuenta el hecho de que el virus VIH infecta y se mantiene en diversos órganos y compartimentos.

Los métodos de pronóstico y/o diagnóstico *in vitro* pueden comprender además ensayos complementarios para confirmar o validar el estado de progresión de trastornos neurológicos o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos, en particular trastornos neurológicos asociados con SIDA o infección por VIH. Estos ensayos comprenden:

- a) identificar cambios volumétricos en los ganglios basales de dicho paciente, preferentemente por mediciones por captura de imágenes de resonancia magnética; y/o
- b) identificar cambios metabólicos en los ganglios basales de dicho paciente, preferentemente calculando la relación de colina/N-acetil Aspartato en suero (Cho/NAA).

Todos los métodos descritos en el presente documento se implementan *in vitro*.

La invención también se refiere a uso de proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma como se ha definido anteriormente para la fabricación de un kit, un marcador o medio para el pronóstico *in vitro* del estado de progresión de trastornos neurológicos o el estado de progresión hacia trastornos neurológico de un paciente, en particular un paciente infectado por VIH, obteniéndose dicho pronóstico y diagnóstico por un método que comprende:

- a) poner en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de suero o tanto una muestra de suero como una muestra de líquido cefalorraquídeo, obtenidas de dicho paciente, y preferentemente durante la infección primaria o aguda o durante la infección crónica, con proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma; y
- b) cuantificar los anticuerpos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad 1 (HMGB1) contenida en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo, dicha muestra de suero, o tanto dicha muestra de suero como dicha muestra de líquido cefalorraquídeo.

donde cuanto mayor sea el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1, mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos o de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos, en particular mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos o de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos asociados con infección por VIH.

La solicitud desvela el uso de proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma como se ha definido anteriormente para la fabricación de un kit, un marcador o medios para evaluar la deficiencia inmunitaria de un paciente, en particular un sujeto que se sabe que está infectado por VIH, obteniéndose dicha evaluación por un método que comprende:

- a) poner en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de suero o tanto una muestra de suero como una muestra de líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho sujeto, con proteínas HMGB1 nativa o derivados de la misma; y
- b) cuantificar los anticuerpos específicos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad 1 (HMGB1) contenida en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo, dicha muestra de suero, o tanto dicha muestra de suero como dicha muestra de líquido cefalorraquídeo

donde cuantos más anticuerpos específicos para HMGB1, más alta será la deficiencia inmunitaria.

La solicitud desvela el uso de una proteína de HMGB1 nativa o derivados de la misma como se ha definido anteriormente para la fabricación de un kit, un marcador o medios para determinar el nivel de activación inmunitaria en un paciente, en particular un sujeto que se sabe que está infectado con VIH, obteniéndose dicha determinación por un método que comprende:

- a) poner en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de suero o tanto una muestra de suero como una muestra de líquido cefalorraquídeo, obtenida de dicho sujeto, con proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma; y
- b) cuantificar los anticuerpos específicos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad 1 (HMGB1) contenida en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo, dicha muestra de suero, o tanto dicha muestra de suero como dicha muestra de líquido cefalorraquídeo.

donde cuantos más anticuerpos específicos para HMGB1, más persistente será la activación inmunitaria.

La solicitud desvela el uso de una proteína de HMGB1 nativa o derivados de la misma como se ha definido anteriormente para la fabricación de un kit, un marcador o medios para los métodos de diagnóstico de la invención en un paciente, en particular un sujeto que se sabe que está infectado por VIH.

La fabricación de un kit, un marcador o medios descritos anteriormente también puede comprender, además de la proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma, el uso de una solución de disociación ácida adecuada para disociar los complejos de HMGB1 inmunológico/anticuerpo anti-HMGB1 y/o el uso de medios para cuantificar quimiocinas tales como IP-10 y/o MCP-1. En una realización particular, la fabricación de un kit, marcador o medio descrito anteriormente también comprende el uso de una proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma y una solución de disociación ácida adecuada para disociar los complejos de HMGB1 inmunológico/anticuerpo anti-HMGB1. En otra realización, la fabricación de un kit, un marcador, o medio descrito anteriormente también comprende el uso de una proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma y medios para cuantificar la quimiocina IP-10.

Puede llevarse a cabo cualquiera de los métodos *in vitro* divulgados anteriormente que implican la cuantificación de los anticuerpos específicos para HMGB1 implementando ELISA, u otros métodos de detección inmunológica, usando la proteína de caja de grupo de Alta movilidad I (HMGB1) o derivados de la misma recubriendo un soporte sólido, y opcionalmente usando anticuerpos secundarios capaces de detectar los anticuerpos específicos de HMGB1.

Cuando se trata de la cuantificación de la quimiocina IP-10 y/o de la quimiocina MCP-1, puede usarse ELISA o cualquier otro método conocido en la técnica.

5 Los inventores también han demostrado que la proteína HMGB1 en sí misma puede ensayarse en una muestra de líquido cefalorraquídeo.

10 En consecuencia, otro aspecto más desvelado en el presente documento implica detección de una concentración aumentada de HMGB1 en muestra de líquido cefalorraquídeo de sujetos infectados por VIH. También puede usarse una correlación positiva entre la carga viral y la concentración de HMGB1 en una muestra de líquido cefalorraquídeo, para supervisar la infección por VIH. La concentración de HMGB1 puede cuantificarse con ensayos de diagnóstico bien conocidos, tales como ensayos de ELISA. Están disponibles en el mercado hHMGB1 recombinante, anticuerpos monoclonales anti-hHMGB1 y suero de conejo anti-hHMGB1 y pueden usarse en dichos ensayos de diagnóstico.

15 La solicitud desvela un método *in vitro* para supervisar la infección por VIH en un sujeto infectado con VIH que comprende cuantificar la proteína de caja de grupo de Alta movilidad I (HMGB1) contenida en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de dicho sujeto, en particular poniendo en contacto la muestra biológica de dicho sujeto infectado con VIH, con anticuerpos que se unen inmunológicamente a caja de grupo de Alta movilidad I (HMGB1), donde la proteína HMGB1 a la que se dirige la cuantificación es la proteína HMGB1 total o su fracción en  
20 circulación (HMGB1 en circulación residual) o su fracción en complejo inmunológico.

25 La solicitud desvela un método *in vitro* para supervisar la carga viral de VIH de un sujeto que se sabe que está infectado con VIH, que comprende llevar a cabo la cuantificación de la proteína HMGB1 en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de dicho sujeto, donde cuanto más proteína HMGB1, mayor la carga viral. Por "carga viral", se entiende el ARN de VIH (que deriva de partícula virales y presentes en el plasma) o el ADN de VIH (que está integrado en el genoma celular y presenta en células). Los métodos basados en la cuantificación de HMGB1 son adecuados para supervisar la carga viral de ARN de VIH.

30 Los métodos para supervisar la infección por VIH o una carga viral pueden implementarse basándose en la cuantificación de la HMGB1 en circulación (residual), basándose en la cuantificación de la HMGB1 total o basándose en la cuantificación de la fracción de complejo de anticuerpos específicos / HMGB1 inmunológica.

35 Estos métodos se basan en la cuantificación de HMGB1 en circulación o HMGB1 total. Cuando la cuantificación se basa en la HMGB1 total, los métodos de la invención también comprenden una etapa adecuada para disociación de complejos inmunológicos formados con anticuerpos específicos de HMGB1, y por ejemplo los métodos de la invención usan o incluyen un tratamiento ácido de la muestra de líquido cefalorraquídeo.

40 Un tratamiento ácido adecuado comprende poner en contacto la muestra de líquido cefalorraquídeo con una solución de disociación ácida, que tiene un pH bajo, preferentemente entre pH 1 y 3, seleccionado para separar la proteína HMGB1 del anticuerpo específico sin alterar la proteína HMGB1 y su capacidad de reconocimiento por anticuerpos específicos. En una realización particular, la solución de disociación ácida es glicina (por ejemplo, 1,5 M) a un pH bajo, preferentemente entre pH 1 y 3 (por ejemplo 1,85). El tratamiento ácido se detiene después con un tampón de neutralización (tal como Tris, por ejemplo Tris 1,5 M, pH 9). En otra realización preferida, en combinación con la previa o no, la incubación con la solución de disociación ácida se lleva a cabo a temperatura entre 20 y 37 °C, preferentemente a 25 °C y/o la etapa de neutralización tiene lugar en hielo.

45 La cuantificación de la proteína HMGB1 puede compararse con la cantidad de HMGB1 de una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de un sujeto no infectado con VIH, o con la cantidad de HMGB1 de una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida en un momento diferente.

50 La solicitud desvela, para las mismas aplicaciones, a un método que comprende la cuantificación de HMGB1 (por ejemplo como se ha descrito anteriormente) en la muestra de líquido cefalorraquídeo y en la muestra de suero de un individuo infectado por VIH, llevándose a cabo ambas cuantificaciones en el mismo individuo y al mismo tiempo y, opcionalmente, la cuantificación de la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1, ambas en la muestra de líquido cefalorraquídeo y la muestra de suero del mismo individuo y al mismo tiempo.

55 La solicitud desvela un kit que puede usarse para implementar una de las siguientes aplicaciones: supervisar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de un sujeto infectado por VIH, supervisar la carga viral de VIH de un sujeto infectado por VIH que no está en tratamiento para infección por VIH, llevar a cabo el pronóstico del estado de progresión de síndrome de inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o el estado de progresión hacia SIDA de un paciente infectado con VIH, llevar a cabo el pronóstico del estado de progresión de trastornos neurológicos de un paciente, en particular trastornos neurológicos asociados con síndrome de inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o con infección por VIH o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos de un paciente, en particular trastornos neurológicos asociados con SIDA de un paciente infectado con VIH o con infección por VIH, evaluar la deficiencia inmunitaria de un paciente, en particular un sujeto infectado por VIH, determinar el nivel de activación inmunitaria especialmente activación inmunitaria persistente en un paciente, en particular un sujeto infectado por VIH, supervisar

el estado de un sujeto infectado por VIH y en métodos de diagnóstico de la invención.

Este kit comprende proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma como se ha definido anteriormente, y opcionalmente una solución de disociación ácida adecuada para disociar complejos inmunológicos de HMGB1/anticuerpo anti-HMGB1 hallados en la muestra biológica, cuando se toma del paciente, tal como se ha definido anteriormente, y opcionalmente medios para cuantificar la quimiocina IP-10 y/o medios para cuantificar la quimiocina MCP-1. Opcionalmente, este kit también puede contener un tampón de neutralización, por ejemplo como se ha definido anteriormente y/o anticuerpos secundarios que se unen y/o revelan la formación del complejo de HMGB1/anticuerpos específicos. Opcionalmente, este kit también puede contener instrucciones para su uso (prospecto). Como se describe en el presente documento, el kit comprende una proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma y solución de disociación ácida para disociar complejos de HMGB1/anticuerpo anti HMGB1 inmunológicos. Como se describe en el presente documento, el kit comprende una proteína HMGB1 nativa o derivados de la misma y medios para cuantificar la quimiocina IP-10.

El kit se implementa para cuantificar los anticuerpos anti-HMGB1 de cualquier muestra biológica, en particular de la muestra de líquido cefalorraquídeo de un paciente infectado por VIH o de la muestra de suero de un paciente infectado por VIH o cuando se requiere cuantificación paralela tanto de la muestra de líquido cefalorraquídeo como de la muestra de suero de dicho paciente infectado por VIH.

## Breve descripción de los dibujos

**Figura 1: Detección de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 en LCR de pacientes infectados por VIH-1.** A- Panel izquierdo. Se cuantificó la concentración de HMGB1 por Elisa (Shinotest, IBL), en LCR de 10 donantes sanos (HD) y 23 pacientes infectados por VIH-1 con trastornos neurológicos. Las representaciones de Caja y Bigotes representan la media  $\pm$  DT de la concentración de HMGB1 en LCR (límite de detección 0,25 ng/ml) en los dos grupos [0,5 ng/ml (intervalo 0,25-1,47) en HD frente a 1,67 ng/ml (intervalo 0,25 – 15,9) en pacientes]. A- Panel derecho. Los pacientes infectados por VIH se estratificaron del estadio 2 al estadio 4 de acuerdo con la gravedad del trastorno neurológico, obteniéndose LCR para pacientes del estadio 3 y estadio 4 solamente. Se detectó HMGB1 a mayores concentraciones en LCR de pacientes de estadio 3 frente a HD, pero debido a la variabilidad de los valores, las diferencias entre HD y los pacientes de ambos grupos no fueron estadísticamente significativas. B – Panel izquierdo. Se cuantificó la concentración de Ab anti-HMGB1 por Elisa en LCR de 10 donantes sanos (HD) y 23 pacientes infectados por VIH-1 con trastornos neurológicos. Las representaciones de Caja y Bigotes representan la media  $\pm$  DT de concentración de anti-HMGB1 en LCR (los valores de media e intervalo están indicados en las cajas). Se presenta el p valor de diferencias significativas (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico). B- Panel derecho. Se ensayaron LCR de pacientes de estadio 3 (n=12) y estadio 4 (n=11) con respecto a Ab anti-HMGB1 y se compararon con HD (n=10). Las representaciones de Caja y Bigotes representan la media  $\pm$  DT de concentración anti-HMGB1. Se presenta el p valor de diferencias significativas (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico).

**Figura 2: Impacto de la carga viral en los niveles de HMGB1 y anticuerpo anti-HMGB1 en LCR.** A- Los pacientes se estratificaron en 2 grupos de acuerdo con la carga viral del LCR (VL): indetectable (es decir, < 40 copias/ml) y positiva (VL > 40 copias/ml). Los valores medios se indican en cada caja. Se compararon las concentraciones de HMGB1 y anti-HMGB1 entre estos 2 grupos y se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico). B- Correlaciones de Spearman entre las concentraciones en LCR de HMGB1 o anticuerpos anti-HMGB1 y Log VL en LCR. Se presentan el coeficiente de correlación (r) y los p valores. C: correlaciones de Spearman entre VL de plasma y concentración de HMGB1 en LCR (panel izquierdo) o VL de LCR (panel derecho). Se presentan el coeficiente de correlación (r) y los p valores.

**Figura 3: Correlación de los niveles de anticuerpo anti-HMGB1 en LCR con la evolución de la enfermedad.** A- El número de linfocitos T CD4 periféricos se correlaciona con la evolución de la enfermedad. Los pacientes se estratificaron en 3 grupos de acuerdo con sus números de linfocitos T CD4 en sangre, y se compararon los niveles de HMGB1 y anticuerpo anti-HMGB1 entre los 3 grupos. Se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico). B- Correlaciones de Spearman entre las concentraciones en LCR de HMGB1 o Ab anti-HMGB1 y los números de linfocitos T CD4. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores.

**Figura 4: Correlación de los niveles de HMGB1 y anticuerpo anti-HMGB1 en LCR con activación inmunitaria.**

A- VL de LCR, se compararon los % de T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> entre los tres grupos de pacientes estratificados de acuerdo con su número de linfocitos T CD4. Se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico). B- correlaciones de Spearman entre VL de LCR o suero y el % de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> o linfocitos T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores. C- Panel superior: correlaciones de Spearman entre anticuerpos anti-HMGB1 en LCR y el % de linfocitos T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> o linfocitos T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>. Panel inferior: correlaciones de Spearman entre HMGB1 en LCR y el % de linfocitos T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores.

**Figura 5: Cuantificación de 24 citocinas y quimiocinas en LCR de pacientes de estadio 3 y estadio 4.** Se ha cuantificado un panel de 24 citocinas y quimiocinas por tecnología MAP (Luminex) en LCR de HD, pacientes de estadio 3 y estadio 4. Las representaciones de Caja y Bigotes representan la media  $\pm$  DT de un panel de quimiocinas. Solo se detectaron IP-10 y MCP-1 a niveles significativos. Se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico) para comparaciones estadísticas entre pacientes y HD,

**Figura 6: Correlación de los niveles de IP-10 y MCP-1 en LCR con la carga viral de LCR y la evaluación de la enfermedad.** A- Correlaciones de Spearman entre IP-10 en LCR y VL de LCR, % de T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y % de CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores. B, C- Correlaciones de Spearman entre MCP-1 en LCR y el número de linfocitos T CD4 en sangre, el % de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (B) e IL-10 en LCR (C). Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores.

**Figura 7: Correlación de IP-10 y MCP-1 en LCR en pacientes de estadio 3 y estadio 4, y con anticuerpos anti-HMGB1.** A- Concentraciones comparativas de IP-10 (panel superior) y MCP1 (panel inferior) en pacientes en estadio 3 o estadio 4 y HD. Los valores medios están indicados en la parte inferior de la figura. Se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico) para comparaciones estadísticas entre pacientes y HD. B- Se muestran correlaciones de Spearman entre anticuerpos anti-HMGB1 en LCR e IP-10 en LCR o MCP1 en LCR. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores.

**Figura 8: Correlación de los niveles de anticuerpo anti-HMGB1 en suero en el estadio 2 con VL de plasma.** A- Comparación de las concentraciones de HMGB1 (panel izquierdo) y anticuerpos anti-HMGB1 (panel derecho) en suero en pacientes infectados por VIH en estadio 1 (n=33, sin trastorno neurológico), estadio 2 (n=41, trastorno neurológico leve), estadio 3 (n=17) y estadio 4 (n=13). Se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico) para comparaciones estadísticas entre los grupos de pacientes. B- Los pacientes se estratificaron en 2 grupos de acuerdo con la VL de LCR: indetectable (es decir <40 cp/ml, n=55) y positiva (VL<40 cp/ml, n=28). Se compararon los números de linfocitos T CD4 y Ab anti-HMGB1 entre estos 2 grupos y se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico). C- Los pacientes se estratificaron de acuerdo con VL como se indica en el eje x. Se compararon las concentraciones de anticuerpos anti-HMGB1 y HMGB1 (paneles superior izquierdo e inferior) para cada grupo y se presentan los p valores (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico). El panel superior derecho muestra la correlación de Spearman entre anticuerpos anti-HMGB1 y VL de suero en 105 pacientes. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores.

**Figura 9: Correlación entre niveles de anticuerpo anti-HMGB1 en suero con IP-10** A- Correlaciones de Spearman entre los niveles de anticuerpo anti-HMGB1 e IP-10 (panel izquierdo) o HMGB1 (panel derecho) en suero de 106 pacientes. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores. B- Correlaciones de Spearman entre IP-10 y el número de linfocitos T CD4 (panel izquierdo) o % de T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (panel derecho) en suero de 105 y 86 pacientes respectivamente. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores.

**Figura 10: La supresión de VL con HAART está asociada con reducción de anti-HMGB1, HMGB1, IP-10, MCP-1 en LCR y activación inmunitaria.** Los pacientes se estratificaron de acuerdo con el hecho de que recibieron HAART o ninguna terapia antirretroviral. Los niveles medios de carga viral (VL), HMGB1, anticuerpos anti-HMGB1 (Ab) (A), el porcentaje de células CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (B), y los niveles de IP-10 y MCP1 (C) se compararon entre los dos grupos (ensayo de Mann-Whitney no paramétrico). Se presentan los p valores.

**Figura 11: Persistencia de HMGB1, anti-HMGB1, IP-10 y MCP1 en LCR de pacientes con carga viral suprimida.** Se compararon los niveles de HMGB1, anti-HMGB1, IP-10 y MCP1 en LCR en 66 pacientes con VL<40 cp/ml y 10 donantes sanos (HD). Se muestra la mediana de los valores (percentiles 25%-75%). Se realizaron comparaciones estadísticas con el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico. Se presentan los p valores.

**Figura 12: Se asocian trastornos neurológicos con niveles aumentados de Ab anti-HMGB1 en suero en pacientes con VL suprimida.** Los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 (Ab) y HMGB1 se compararon entre los diferentes estadios neurológicos (A) o entre pacientes con estadios 2, 3 y 4 (n=45) y pacientes de estadio 1 (n=21) (B), presentando todos ellos una VL<40 cp/ml. Se muestran los valores medios y se realizaron comparaciones estadísticas con el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico. Se presentan los p valores. C- Se realizaron las mismas comparaciones que en B (estadio 1 frente a pacientes con estadios 2, 3 y 4) para los parámetros indicados. No se encontraron diferencias estadísticas para ninguno de estos parámetros.

**Figura 13: Correlaciones entre anti-HMGB1, MCP1, IP-10 y activación inmunitaria en pacientes con estadios 2, 3 y 4 y carga viral suprimida.** A, B, C- Correlaciones de Spearman entre parámetros indicados en suero de 45 pacientes VIH<sup>+</sup> con estadios 2, 3 y 4 y VL<40 cp/ml. Se presentan los coeficientes de correlación (r) y p valores.

**Figura 14: Parámetros clínicos e inmunológicos de pacientes incluidos en el estudio.** Se seleccionaron aleatoriamente pacientes infectados por VIH entre sujetos de más de 18 años de edad, independientemente del

recuento de células CD4 y la carga viral. Los criterios de exclusión fueron: diagnóstico previo de HAND, infección oportunista activa, cualquier historial de trastorno neurológico. HAND se definió como se menciona en el texto. HMGB1, anti-HMGB1, IP-10 y MCP1 se cuantificaron como se ha descrito en la presente solicitud. El P valor se determinó con el ensayo de Mann-Whitney. P<0,05 se consideró significativo.

5 **Figura 15: Los pacientes con HAND y sin HAND muestran parámetros clínicos y virológicos comparables.** Para cada paciente, se registraron o cuantificaron los marcadores indicados (recuentos de CD4 tras inclusión, CD4 mínimo, ARN de VIH en plasma, ADN de VIH, marcadores de activación). Estos marcadores se compararon en pacientes con HAND y pacientes sin HAND. No se detectaron diferencias significativas para ningún marcador (ensayo de Mann-Whitney).

10 **Figura 16: Los niveles de HMGB1 y anti-HMGB1 son significativamente diferentes en pacientes con HAND y sin HAND vírémicos o avirémicos.** Los niveles en suero de HMGB1 y anti-HMGB1 se cuantificaron para todos los pacientes de acuerdo con los métodos descritos en la presente solicitud. Sus niveles se compararon entre pacientes con HAND y sin HAND independientemente de su carga viral, o teniendo en cuenta solamente los pacientes vírémicos o avirémicos. Se realizó análisis estadístico usando el ensayo de Mann-Whitney. P<0,05 se consideró significativo.

15 **Figura 17: Los niveles en suero de IP-10 se correlacionan con la activación inmunitaria, MCP-1, anti-HMGB1 y CD4 mínimo.** Se muestran las correlaciones entre los niveles de IP10 en suero y parámetros inmunitarios indicados. Se usó el ensayo de correlación de Spearman. P<0,05 se consideró significativo.

20 **Figura 18: Los niveles en suero de MCP-1 se correlacionan con la activación inmunitaria, IP-10, HMGB1 y CD4 mínimo.** Se muestran las correlaciones entre los niveles de MCP-1 en suero y los parámetros inmunitarios indicados. Se usó el ensayo de correlación de spearman. P<0,05 se consideró significativo.

25 **Figura 19: Cambios volumétricos de ganglios basales en pacientes con HAND y correlación con cambios metabólicos.** Se midieron los cambios volumétricos de ganglios basales (BG) y relación Cho/NAA por MRI, como se describe en la memoria descriptiva. Los pacientes con HAND tuvieron mayor putamen (valor jacobiano menor de 1) (A) y mayores relaciones Cho/NAA en espectroscopia de MRI de BG (B). Los volúmenes mayores de putamen se correlacionaron con mayores valores de Cho/NAA (p=0,02) (C).

30 **Figura 20: El deterioro neurológico (la relación Cho/NAA) se correlaciona con los niveles de Ab anti-HMGB1 e IP10.** La mayor activación inmunitaria (% de linfocitos T CD8+CD38+HLA-DR+), y niveles aumentados de Ab anti-HMGB1 e IP10 se correlacionan con los valores de Cho/NAA aumentados. Se realizó un análisis estadístico usando el ensayo de Mann-Whitney. P<0,05 se consideró significativo.

### Ejemplos

#### 40 I. Detección de proteína HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 en muestra (suero y/o líquido cefalorraquídeo humano)

Se cuantificó la concentración de proteína HMGB1 (es decir, proteína HMGB1 en circulación residual) en muestra de pacientes infectados por VIH, de acuerdo con el kit de ELISA Shino Test (IBL).

45 Además, se desarrolló un ensayo de Elisa específico para la detección de anticuerpos específicos anti-HMGB1 totales. Se han usado los siguientes reactivos:

- Se dirigen anticuerpos policlonales primarios de conejo para HMGB1 humana (Adcam ab18256) contra un péptido sintético conjugado con KLH derivado de los restos 150 a C terminal de HMGB1 humana.
- 50 - BOXB recombinante de HMGB1 (HMGBiotech HM-051) producida en *E. coli* de un plásmido de expresión que codifica la secuencia de mamífero, que es totalmente idéntica en ser humano y ratón.
- Suero de conejo de control (Sigma; Ref: R9133)
- IgG o IgM anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (PAL), comprimidos de sustrato p-nitrofenil fosfato (pNPP),
- 55 - calibradores: IgG humana de suero (Sigma; ref 12511) e IgM Humana de suero (Sigma; ref 18260)
- Anticuerpo de fosfatasa alcalina anti IgG humana (específico de Fc) producido en cabra (Sigma; Ref A9544), anticuerpo de fosfatasa alcalina anti IgM humano (específico de cadena  $\mu$ ) producido en cabra (Sigma; ref A3437)

60 El ensayo de Elisa, para cuantificar anticuerpos específicos anti HMGB1, se llevó a cabo como sigue:

Se realizó revestimiento de placas de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con 0,5  $\mu$ g/ml de BOXB en DPBS. Simultáneamente, se realizó revestimiento del calibrador con diluciones en serie en DPBS de isotipos correspondientes (solo para el ensayo de ELISA llevado a cabo con muestras humanas). Las placas se lavaron cuatro veces con DPBS/Tween® 20 0,05% (v/v), usando un lavador de microplacas (Atlantis; Oasys). Se realizaron lavados similares después de cada etapa del ensayo de ELISA. Los sitios no unidos se bloquearon a

4 °C durante 2 horas con PBS/BSA 2% (p/v). Se añadieron alícuotas de 100 µl de muestra diluida en DPBS/Tween® 0,05% (v/v)/BSA 1 % (P/V) a pocillos recubiertos y no recubiertos y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Todas las muestras se han ensayado tratadas con Glicina 1,5 M (v/v, pH 1,85) durante 30 minutos a 25 °C en un baño de agua, y mantenidas además en hielo y diluidas con Tris 1,5 M, v/v, pH 9,0. Las muestras se diluyeron inmediatamente (de 1/10 a 1/1000) y se distribuyeron en placas revestidas. Se añadieron anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina anti IgG de conejo (relación 1/10000) o anticuerpos de cabra conjugados con fosfatasa alcalina anti IgG (relación 1/2000) o IgM (relación 1/2000) humana diluidos en DPBS/Tween® 0,05% (v/v)/BSA al 1% (P/V) durante 1 hora a 37 °C. Se realizó detección de anticuerpos específicos de antígeno después de 30 minutos de incubación a 37 °C con 100 µl de sustrato de pNPP y la reacción se detuvo mediante adición de 100 µl de NaOH 3 M. La concentración de anticuerpos específicos de BOXB se ha calculado de acuerdo con la curva patrón obtenida a partir de la absorbancia de la solución de inmunoglobulina convencional por el software Ascent, hermoElectrocorp, como han presentado previamente los inventores en un Elisa específico para LPS de Shigella (Launay *et al.* Vaccine 2009, 27: 1184-1191). Los datos se expresan en ng/ml de anticuerpos detectados.

## II. Análisis de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 específicos, así como identificaciones de quimiocina en LCR de pacientes infectados por VIH.

### Pacientes infectados por VIH

El grupo de pacientes analizados con respecto a contenido en LCR de HMGB1 y de anticuerpos anti-HMGB1, es parte de una cohorte de 105 pacientes infectados por VIH de forma crónica, clasificados de acuerdo con trastornos neurológicos asociados con SIDA (como se ha explicado anteriormente). El grupo 1 incluye pacientes infectados por VIH-1 sin trastornos neurológicos, mientras que los grupos 2, 3 y 4 incluyen pacientes con trastornos neurocognitivos crecientes.

### Ila. Correlación de HMGB1 y anticuerpos específicos anti-HMGB1 con carga viral, evolución de la enfermedad e identificaciones de quimiocina

#### **Niveles aumentados de HMGB1 y Ab anti-HMGB1 en muestra de LCR de pacientes infectados por VIH (VIH<sup>+</sup>) en comparación con donantes sanos**

Usando el ensayo de Elisa de Shinotest (IBL) para detección de HMGB1 (límite de detección 0,25 ng/ml) y el ensayo de Elisa interno de los inventores para detección de anticuerpo anti-HMGB1 (límite de detección 90 ng/ml), se han encontrado niveles aumentados tanto de HMGB1 (**Figura 1A**) como de anticuerpos anti-HMGB1 (**Figura 1B**) en LCR de pacientes infectados por VIH (P) en comparación con donantes sanos (HD). El nivel aumentado de HMGB1 en el LCR de pacientes no fue estadísticamente diferente del de HD (**Figura 1A**) mientras que los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 aumentaron significativamente en comparación con HD (**Figura 1B**). La estratificación de los pacientes de acuerdo con su estadio neurológico mostró que se observaron niveles aumentados tanto de HMGB1 como de anticuerpos anti-HMGB1 en LCR para pacientes en estadio 3 y 4. Solamente los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 fueron estadísticamente diferentes de los de HD (**Figura 1**).

#### **HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 de la muestra de LCR se correlacionan con carga viral**

El VIH-1 probablemente dirige la producción de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 en LCR. Esto está sugerido por el mayor nivel de ambas moléculas en pacientes con carga viral incontrolada (VL) en comparación con pacientes con VL indetectable (<40 cp/ml de LCR) (**Figura 2A**). Además, se descubrieron niveles de HMGB1 y anticuerpo anti-HMGB1 correlacionados positivamente con VL de VIH-1 en LCR (**Figura 2B**). Como corolario (considerando que la VL de LCR está fuertemente correlacionada con la VL de plasma, **Figura 2C**), el nivel de HMGB1 en LCR se correlacionó positivamente con la VL de plasma (**Figura 2C**).

#### **Los niveles de anti-HMGB1 en LCR se correlacionan con la evolución de la enfermedad**

El distintivo de la infección por VIH es la desaparición progresiva de linfocitos T CD4 en sangre, y el número periférico de linfocitos T CD4 es un marcador de progresión de enfermedad por VIH. La **Figura 3 A** (panel derecho) muestra que el nivel de anticuerpos anti-HMGB1 en LCR aumenta cuando se reducen los números de linfocitos T CD4, y es significativamente mayor en pacientes con números de linfocitos T CD4 bajos (<300) frente a altos (>600). Además, el nivel de anticuerpos anti-HMGB1 en LCR parece estar correlacionado con la evolución de enfermedad, ya que los anticuerpos anti-HMGB1 se correlacionan negativamente con los números de linfocitos T CD4 (**Figura 3B** panel derecho). Con respecto a los niveles de HMGB1 en LCR, estos no varían con los números de linfocitos T CD4 (**Figura 3A, 3B** paneles izquierdos). Debe observarse que el ensayo que se usó para cuantificación de HMGB1 (Shinotest, IBL) solamente detecta HMGB1 libre residual (es decir, no HMGB1 en complejo con anticuerpos), mientras que el ensayo desarrollado en el laboratorio de los inventores para la cuantificación de anticuerpo anti-HMGB1 detecta los anticuerpos totales, incluyendo los que están en complejo con HMGB1. Por lo tanto los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 (1000 veces más que HMGB1) representan una medida más precisa de la evolución de la enfermedad que el HMGB1 residual.



### Los niveles de HMGB1 y anticuerpo anti-HMGB1 en LCR se asocian con una activación inmunitaria persistente

5 Varios estudios han demostrado que la infección por VIH crónica induce un estado de activación inmunitaria que es un fuerte marcador de la progresión de enfermedad (Giorgi JV, *et al.* Shorter survival in advanced HIV-1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999). La activación inmunitaria puede analizarse mediante la expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CD8 en sangre, en particular CD38 y HLA-DR, cuya combinación está asociada con el riesgo de progresión a SIDA (Liu Z, *et al.* Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the MACS Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16: 83-92). La **Figura 4A** muestra que los porcentajes de linfocitos T CD8+CD38<sup>+</sup> aumentan significativamente en pacientes con bajos números de linfocitos T CD4 (CD4 <300/ $\mu$ l) en comparación con pacientes con altos números (>600/ $\mu$ l), y el estado de activación de los linfocitos T (es decir, el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) está correlacionado positivamente con la carga viral tanto en LCR como en plasma (**Figura 4B**). En este contexto, debe observarse que la expresión de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 está correlacionada positivamente con el estado de activación de los linfocitos T (**Figura 4C**).

20 Por lo tanto, la detección de HMGB1 y anti-HMGB1 en el LCR de pacientes con trastornos neurológicos es la consecuencia de la activación inmunitaria persistente dirigida por VIH.

### Los niveles aumentados de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 en muestra de LCR están asociados con niveles aumentados de las quimiocinas inflamatorias IP-10 y MCP-1.

25 Se ensayó LCR de HD y pacientes VIH<sup>+</sup> con trastornos neurológicos en estadio 3 o estadio 4 con la tecnología MAP (Realización de Perfiles MultiAnalito) para la detección simultánea de 24 citocinas/quimiocinas. La **Figura 5** muestra la comparación de los perfiles de quimiocinas en LCR de HD y pacientes VIH<sup>+</sup>. En LCR de HD, se caracterizaron identificaciones de citocinas/quimiocinas mediante la detección de dos quimiocinas, IP-10 y MCP-1. En LCR de pacientes VIH<sup>+</sup>, estas dos quimiocinas también se detectaron, pero a niveles mayores. La concentración aumentada de IP-10 en LCR de pacientes se correlacionó con VL de LCR (de acuerdo con un informe previo (Paola Cinquea *et al.* Cerebrospinal fluid interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) in HIV-1 infection. *J Neuroimmunology* 2005)) y con el estado de activación de linfocitos T CD8 (**Figura 6A**). De forma similar, las concentraciones aumentadas de MCP-1 se correlacionaron con el estado de activación de linfocitos T, y los niveles de MCP-1 parecían estar correlacionados con la evolución de la enfermedad, como se muestra por la correlación inversa entre la concentración de MCP-1 en LCR y los números de linfocitos T CD4 (Figura 6B). La Figura 6C muestra que los niveles de IP-10 y MCP-1 están correlacionados positivamente en el LCR de los pacientes.

40 Para caracterizar la naturaleza de los mediadores detectados en LCR de pacientes con trastornos neurológicos, se compararon los niveles de IP-10 y MCP-1 entre HD y pacientes de estadio 3 y estadio 4. La Figura 7A muestra que el estadio 3 está asociado con un aumento significativo tanto de IP-10 como de MCP-1. Resulta interesante que las concentraciones de IP-10 y MCP-1 en LCR se asociaron positivamente con los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 (Figura 7B).

45 IIb. Anticuerpos HMGB1, anti-HMGB1 e identificaciones de quimiocinas en sueros de pacientes VIH<sup>+</sup> con trastornos neurológicos.

### Los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 en suero aumentan desde el estadio 2 y están dirigidos por la carga viral de VIH

50 La **Figura 8A** muestra que, desde el estadio 2, los pacientes mostraron un aumento significativo de los niveles de anticuerpo anti-HMGB1 en suero, mientras que los niveles de HMGB1 fueron menos diferenciadores. No hubo diferencias significativas en VL entre los diferentes grupos (no mostrado). La especificación de pacientes basándose en la carga viral en suero (indetectable <40 cp/ml frente a positivo >40 cp/ml) reveló que los anticuerpos anti-HMGB1 aumentaron significativamente en pacientes con carga viral detectable (**Figura 8B**). Como se esperaba, se asoció VL detectable con números reducidos de linfocitos T CD4 (**Figura 8B**). Una estratificación más refinada de VL en suero mostró que los anticuerpos anti-HMGB1 aumentaron significativamente desde VL>1000 cp/ml y los niveles de Ab de HMGB1 se correlacionaron positivamente con VL (**Figura 8C**). Como se observa en LCR, los niveles de HMGB1 fueron menos diferenciadores.

### 60 Los niveles de Ab anti-HMGB1 en suero se correlacionan con concentraciones de IP-10

65 Como se observa en el LCR de los pacientes, se encontró una correlación positiva entre anticuerpos anti-HMGB1 y los niveles de IP-10 (**Figura 9A**). Se descubrió que IP-10 estaba correlacionado con la evolución de enfermedad, puesto que aumenta con la pérdida de CD4, y su producción se asoció con la activación persistente del sistema inmunitario, como se evalúa por la expresión de marcadores de activación en linfocitos T (**Figura 9B**). Resulta interesante que los niveles de HMGB1 y anticuerpos anti-HMGB1 estaban correlacionados de forma inversa (**Figura**

**9A)** lo que sugiere que la producción de anticuerpos anti-HMGB1 está dirigida por la producción de HMGB1, y que los anticuerpos anti-HMGB1 tienen una actividad neutralizadora.

IIc. Los trastornos neurológicos en pacientes con carga viral suprimida están asociados con persistencia de anti-HMGB1 y quimiocinas IP-10 y MCP-1 en LCR y suero

**La supresión de la carga viral (VL) con HAART está asociada con reducción de anti-HMGB1, HMGB1, IP-10, MCP-1 en LCR y activación inmunitaria.**

La terapia antirretroviral exitosa está asociada con supresión de la carga viral en LCR en la mayoría de los pacientes con trastornos neurológicos (**Figura 10A**). Conjuntamente, los niveles de HMGB1, anti-HMGB1 (**Figura 10A**), IP-10 y MCP1 (**Figura 10C**) en LCR se reducen, y la expresión de CD38 y HLA-DR en linfocitos T CD8 también (**Figura 10B**).

**Persistencia de HMGB1, anti-HMGB1, IP-10 y MCP1 en LCR de pacientes con carga viral suprimida en comparación con donantes sanos.**

La comparación de los niveles de citocinas/quimiocinas en LCR de pacientes VIH+ con VL<40 cp/ml y en LCR de donantes sanos reveló la persistencia de HMGB1, anti-HMGB1, IP-10 y MCP-1 (**Figura 11**). Por lo tanto estos datos muestran que los trastornos neurológicos que persisten a pesar de la supresión de VL están asociados con niveles elevados de moléculas anti-HMGB1, IP-10 y MCP1 en el LCR.

**Los Ab anti-HMGB1 en suero distinguen pacientes con estadios 2 a 4 de pacientes de estadio 1, a pesar de la supresión de la replicación viral.**

Se encontraron Ab anti-HMGB1 aún significativamente aumentados en pacientes VIH+ con estadios 2 a 4 en comparación con pacientes VIH+ en el estadio 1 (sin problemas neurológicos), aunque todos estos pacientes mostraron niveles indetectables de VL (<40 cp/ml) (**Figura 12A**). La **Figura 12B y 12C** muestra que no se encontró que los niveles de HMGB1, IP-10 o MCP-1, ni los linfocitos T nCD4, linfocitos T nCD8, Nadir CD4, los porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8 activados, fueran diferentes en pacientes con estadios 2 a 4 frente a pacientes con estadio 1. Por lo tanto, los niveles de anti HMGB1 representan en único factor que distingue pacientes con estadios 2, 3 y 4 de los del estadio 1.

**Correlaciones entre anti-HMGB1, MCP1, IP-10 y activación inmunitaria en pacientes con estadios 2, 3 y 4 y carga viral suprimida**

Para entender las causas de los niveles persistentes de anti-HMGB1 a pesar de la carga viral controlada, se analizaron correlaciones de Spearman entre diversos parámetros asociados con la evolución clínica. La **Figura 13A** muestra que los niveles anti-HMGB1 están correlacionados positivamente con los niveles de IP-10 y MCP-1, que están a su vez relacionados con el estado de activación inmunitaria, medida mediante la expresión de HLA-DR y CD38 en linfocitos T CD4 y CD8 (**Figura 13B**). Como ya se ha observado en la cohorte completa (analizada anteriormente), el estadio de activación inmunitaria es una correlación de la evolución de la enfermedad medida por el número de linfocitos T CD4 (**Figura 13C**). En general, estos datos muestran que se detecta una activación inmunitaria persistente en pacientes con carga viral suprimida y estadios 2, 3 y 4, que dirige la producción de Ab anti-HMGB1. La correlación negativa entre anti-HMGB1 y HMGB1 en suero hallada tanto en la cohorte completa de pacientes (estadio 1 a estadio 4 con carga viral variable) (**Figura 9A**) como en pacientes con estadios 2, 3 y 4 y carga viral suprimida (**Figura 13A**) sugiere una actividad neutralizadora *in vivo* de los anticuerpos.

El estudio de los parámetros inmunológicos que caracterizan una cohorte de pacientes se persiguió con dos objetivos:

(1) extender el análisis a los sueros de la cohorte completa (n=106 pacientes) tanto para determinar si la identificación molecular presentada en LCR con estadios de clasificación 3 y 4 también se halló en suero de pacientes y con la clasificación de HAND/sin HAND; y

(2) evaluar si las mediciones de Captura de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI) que identifican los cambios volumétricos de ganglios basales, y cambios metabólicos ligados a alteraciones del SNC, se correlacionaron con esta identificación molecular.

III. El nivel de proteína HMGB1 en circulación y nivel de anticuerpos anti-HMGB1 totales son los únicos parámetros que distinguen pacientes con HAND de pacientes sin HAND.

Para definir HAND, se usaron los criterios expuestos en Antinori *et al.* (Neurology. 30 Oct 2007; 69(18):1789-99). Se consideró la siguiente correspondencia con la clasificación de estadio 1 a estadio 4 descrita anteriormente; sin HAND (estadios 1 y 2); HAND (estadios 3 y 4).

La **Figura 14** muestra los parámetros clínicos e inmunológicos que caracterizan la cohorte de pacientes estudiados. La mayoría de estos pacientes (81 %) recibieron terapia antirretroviral potente, y el 67 % tuvieron una carga viral suprimida. La deficiencia inmunitaria, como se mide por recuentos de CD4, fue moderada, y los recuentos de CD4 mínimo (es decir, el menor valor de CD4 alcanzado desde el comienzo de la infección) no fueron bajos. El grado de activación inmunitaria fue moderado, teniendo en cuenta que en un paciente no tratado en el estadio de SIDA del 60 al 100 % de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> coexpresan los marcadores de activación CD38 y HLA-DR.

Un tercio de estos pacientes tuvieron HAND (véase posteriormente para información detallada) y la comparación con los grupos sin HAND no mostró ninguna diferencia con respecto a la carga viral, los recuentos de CD4 y de CD4 mínimos, la proporción de pacientes virémicos y el nivel de activación inmunitaria.

Sorprendentemente, la única diferencia significativa entre estos dos grupos se detectó para HMGB1 y anticuerpos anti HMGB1 ( $p=0,006$ , y  $p=0,005$  respectivamente, ensayos de Mann-Whitney no paramétrico). Los niveles en suero de IP-10 y MCP-1 no pudieron diferenciar entre pacientes con HAND y sin HAND (**Figura 14**). La similitud de los parámetros inmunológicos y virológicos, en pacientes con HAND y sin HAND, se muestra como histogramas en la **Figura 15**.

Como se menciona anteriormente, HMGB1 y anti-HMGB1 fueron los únicos dos parámetros que diferenció a los dos grupos de pacientes (**Figura 16**). Esta diferenciación fue independiente de la carga viral de ARN, ya que se observó en pacientes avirémicos ( $VL < 40$  copias/ml).

Aunque los niveles de quimiocinas IP-10 y MCP1 no fueron estadísticamente diferentes entre pacientes con HAND y sin HAND (**Figura 14**), su producción durante la infección se correlacionó positivamente con activación inmunitaria persistente, los niveles de anti-HMGB1 y MCP-1 y la evolución de la enfermedad, lo que sugiere que la inflamación crónica es responsable de la liberación de quimiocinas. (**Figura 17 y 18**). Estas observaciones confirman las conclusiones previamente indicadas para LCR de pacientes infectados por VIH (ejemplo IIA y Figuras 5, 6 y 7).

#### IV. Una identificación inmunológica correlacionada con cambios volumétricos y metabólicos en ganglios basales en pacientes infectados por VIH con HAND.

Cada paciente realizó ensayos neurológicos que exploraban un amplio espectro de dominios cognitivos. De acuerdo con los resultados del ensayo de NP, los pacientes se dividieron en dos grupos, los que tenían HAND y los que no tenían HAND (véase Antinori *et al.* anteriormente). Se realizó análisis de MRI para algunos pacientes. Se creó una imagen tridimensional promedio, y se fusionó además con un atlas cerebral digital (del Instituto Neurológico de Montreal), en el que se habían identificado ganglios basales (BG) izquierdos y derechos. Esto permitió calcular para cada imagen el volumen y la cantidad de dilatación o contracción, medida por el valor jacobiano. Los valores menores de 1 indican una dilatación de la imagen del sujeto con respecto al molde, mientras que los valores por encima 1 sugieren una reducción del volumen. Se calcularon cambios metabólicos en BG. Colina/N-acetil Aspartato (Cho/NAA) es un marcador de la inflamación neuronal y se determinó como se ha descrito previamente en la bibliografía (Ratai EM *et al.* PLoS One. 7 May 2010; 5(5):e10523; Yiannoutsos CT *et al.* Neuroimage. 1 Mar 2008; 40(1):248-55. Paul RH *et al.* J Neuropsychiatry Clin Neurosci. Verano de 2007; 19(3):283-92 Greco JB *et al.* Magn Reson Med. Jun 2004; 51(6):1108-14. Meyerhoff DJ *et al.* AJNR Am J Neuroradiol. May 1996; 17(5):973-8). En los BG de pacientes infectados por VIH con alteración cognitiva, la relación Cho/NAA generalmente está aumentada.

La **Figura 19A** muestra que los pacientes con HAND tenían mayor putamen (valor jacobiano menor de 1;  $p=0,008$ ). Los pacientes con HAND tuvieron relaciones con Cho/NAA mayores en espectroscopia de MRI de BG (Figura 19B). Se muestran las relaciones entre parámetros volumétricos y metabólicos en la Figura 19C: se correlacionaron mayores volúmenes de putamen con valores de Cho/NAA por encima de 0,575 ( $p=0,02$ ).

Para investigar una posible relación entre los parámetros neurológicos e inmunológicos, los pacientes se estratificaron de acuerdo con relaciones Cho/NAA, y se compararon los marcadores inmunitarios. La **Figura 20** muestra que una activación inmunitaria aumentada (% de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) y altos niveles de anti-HMGB1 e IP10 se correlacionan con valores de Cho/NAA aumentados.

#### **Conclusión**

Este análisis detallado de mediadores solubles detectados en suero y LCR de pacientes infectados por VIH, algunos de los cuales padecen trastornos neurológicos asociados con SIDA, ha mostrado en LCR un perfil de inflamación, caracterizado por niveles importantes de anticuerpos anti-HMGB1 (en reacción a HMGB1 liberada) asociados con alta expresión de la quimiocina IP-10. Las quimiocinas se han implicado en la inmunopatogénesis de trastornos neurológicos, tales como Esclerosis Múltiple (MS) y en particular se ha indicado que IP-10 aumenta en LCR de pacientes con MS cuando la inflamación es prominente (Scarpini E *et al.* J Neurological Sciences 195: 41, 2002). En pacientes infectados por VIH, un estudio indicó que los niveles de IP-10 aumentaban en sujetos con infecciones por VIH primarias y asintomáticas y complejo de demencia del SIDA, y se correlacionaron positivamente con la carga viral de LCR (Paola Cinquea *et al.* Cerebrospinal fluid interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) in HIV-1 infection. J Neuroimmunology 2005). IP-10 es un potente quimioatrayente y se ha sugerido que potencia la infección

por retrovirus y media en la lesión neuronal. También se ha sugerido que las propiedades proinflamatorias de MCP1 y su capacidad para regular positivamente la replicación de VIH-1 contribuyen al desarrollo de riesgo aumentado de demencia. MCP-1 puede facilitar la migración de monocitos infectados y/o activados al cerebro donde se convierten en células hospedadoras para la replicación de VIH-1 y activando macrófagos, microglía y astrocitos lo que da como resultado liberación de varias neurotoxinas potentes (Dhillon *et al.* Roles of MCP-1 in development of HIV-dementia. *Front Biosci.* 2008, 13: 3913-3918). Las observaciones de los inventores proporcionan nuevos hallazgos que demuestran que la alarmina HMGB1, y de forma más importante los anticuerpos específicos para esta alarmina, se detectan (además de IP-10 y MCP-1) en LCR de pacientes infectados por VIH con estadios 2 a 4, y que representan una correlación de la replicación viral y evolución de enfermedad. Además, la persistencia de anticuerpos anti-HMGB1 en pacientes con replicación viral suprimida es un determinante de estadios 2 a 4.

Los resultados en la cohorte sin HAND/con HAND muestran que la HAND se asocia con un patrón inflamatorio que puede revelarse con MRI (mayor putamen, aumento de Cho/NAA) y/o mediante marcadores inmunitarios, incluyendo marcadores de activación en linfocitos T periféricos (expresión de CD38 y HLA-DR) y/o mediadores inflamatorios. Este estudio muestra por primera vez que los niveles de anticuerpos anti-HMGB1 e IP-10 en suero totales se correlacionan con alteraciones de los BG en pacientes con HAND, lo que confirma la importancia de la medición de estas dos moléculas en la sangre de pacientes que desarrollan HAND. Resulta importante que estas observaciones ligan por primera vez los parámetros de MRI y espectroscopia asociados con HAND, tales como mayor putamen y niveles de Cho/NAA aumentados, con parámetros inmunológicos (anticuerpos anti-HMGB1 e IP-10) y marcadores de activación inmunitaria/inflamación.

Estos resultados sugieren que la combinación de HMGB1/anticuerpos anti-HMGB1, IP-10, MCP-1, es tanto una respuesta a como un determinante que contribuye a la infección local en el SNC. La presente solicitud muestra que la determinación molecular de anticuerpos anti-HMGB1, e IP-10 y/o MCP-1 puede ser útil en el diagnóstico y pronóstico del complejo de enfermedades en las que se ha mostrado que está implicada HMGB1, con o sin trastornos neurológicos, tales como SIDA.

**Modificaciones y otras realizaciones**

Resultarán evidentes diversas modificaciones y variaciones de los productos, composiciones y métodos desvelados así como el concepto de la invención para los expertos en la materia sin alejarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debería entenderse que no se pretende que la invención como se reivindica se limite a dichas realizaciones específicas. Se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en la técnica médica, inmunológica, biológica, química o farmacológica, estén dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de pronóstico *in vitro* del estado de progresión de trastornos neurológicos o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos, de un paciente, que comprende:

- 5 a) poner en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de suero o tanto una muestra de suero como una muestra de líquido cefalorraquídeo, obtenidas de dicho paciente, con proteína HMGB1 nativa o derivados de proteína HMGB1 siempre que estos derivados se unan con anticuerpos específicos para HMGB1; y  
 10 b) cuantificar los anticuerpos específicos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad I (HMGB1), contenida en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo, dicha muestra de suero, o tanto dicha muestra de suero como dicha muestra de líquido cefalorraquídeo.

donde cuanto mayor sea el nivel de los anticuerpos específicos para HMGB1 mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos o de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos.

15 2. El método de pronóstico *in vitro* del estado de progresión de trastornos neurológicos, o el estado de progresión hacia trastornos neurológicos, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además cuantificar la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1, en dicha muestra, en particular una muestra de suero o una de líquido cefalorraquídeo, o tanto en dicha muestra de suero, como en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo, obtenidas de  
 20 dicho paciente, donde cuanto mayor sea el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1 y mayor la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1, mayor será el riesgo de desarrollar trastornos neurológicos o de desarrollar un estadio avanzado de trastornos neurológicos.

25 3. El método de pronóstico *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dichos trastornos neurológicos se asocian con una enfermedad o trastorno que se selecciona del grupo que consiste en (1) enfermedades o trastornos de origen infeccioso, por ejemplo, infección bacteriana, infección patógena, infección viral, o infección por prion, tal como infección por VIH; y (2) enfermedades o trastornos cuyo origen no es infeccioso o cuyo origen es desconocido, por ejemplo, lesión neuronal aguda, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, lesión cerebral postisquémica, enfermedad de Parkinson, cualquier trastorno que afecte al sistema  
 30 nervioso periférico y/o a la médula espinal, tal como lesión de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, y enfermedades desmielinizantes tales como esclerosis múltiple (EM).

4. El método de pronóstico *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además:

- 35 (a) identificar cambios volumétricos en los ganglios basales de dicho paciente, preferentemente por mediciones de captura de imágenes de resonancia magnética; y/o  
 (b) identificar cambios metabólicos en los ganglios basales de dicho paciente, preferentemente calculando la relación en suero de Colina/N-acetil Aspartato (Cho/NAA).

40 5. El método de pronóstico *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dichos trastornos neurológicos se asocian con la infección por VIH en un paciente infectado con VIH.

45 6. El método de pronóstico *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dichos trastornos neurológicos se asocian con infección por VIH en un paciente infectado con VIH y sometido a terapia retroviral.

7. Un método de diagnóstico *in vitro* de la presencia de trastornos neurológicos en un paciente, que comprende:

- 50 (a) evaluar la presencia o ausencia de trastornos neurológicos por criterios clínicos convencionales; y  
 (b) cuantificar los anticuerpos específicos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad 1 (HMGB1) contenida en una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de suero, o tanto una muestra de suero como una muestra de líquido cefalorraquídeo, obtenidas de dicho paciente, después de poner en contacto dicha muestra con proteína HMGB1 nativa o derivados de la proteína HMGB1 siempre que estos derivados se unan con anticuerpos  
 55 específicos para la HMGB1;

donde el nivel de anticuerpos específicos para HMGB1 se correlaciona con el diagnóstico de la presencia de trastornos neurológicos por criterios clínicos convencionales.

60 8. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además la cuantificación de otras moléculas halladas en la muestra tales como quimiocinas, y preferentemente la cuantificación de la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1.

65 9. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde dichos trastornos neurológicos se asocian con SIDA en un paciente infectado por VIH.

10. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende antes de poner en contacto la muestra con la proteína HMGB1 nativa o derivados de la proteína HMGB1 siempre que estos derivados se unan con anticuerpos específicos para HMGB1, una etapa de tratar la muestra por un tratamiento ácido para disociar los complejos inmunitarios hallados en la muestra, preferentemente con Glicina 1,5 M a un pH bajo, y donde en dicho método, los anticuerpos cuantificados específicos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad 1 (HMGB1) son anticuerpos totales específicos para HMGB1.
11. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los anticuerpos cuantificados específicos para la Caja del Grupo de Alta Movilidad 1 (HMGB1) son la fracción en circulación de dichos anticuerpos (anticuerpos en circulación) o su fracción en complejo inmunológico.
12. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el derivado de proteína HMGB1 se selecciona del grupo que consiste en una HMGB1 recombinante, una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1, una parte inmunológicamente reactiva de HMGB1 cuya secuencia es común a las proteínas HMGB1 de diversos orígenes y la BOXB recombinante de HMGB1 recombinante correspondiente a la secuencia común a ser humano y ratón de HMGB1.
13. Uso de un kit para llevar a cabo el pronóstico del estado de progresión de trastornos neurológicos de un paciente, o estado de progresión hacia trastornos neurológicos de un paciente, donde dicho kit comprende:
- a) proteína HMGB1 nativa o derivados de la proteína HMGB1 siempre que estos derivados se unan con anticuerpos específicos para la HMGB1;
  - b) opcionalmente, una solución de disociación ácida que tiene un pH entre 1 y 3, para disociar complejos inmunológicos de HMGB1/anticuerpo anti-HMGB1 hallados en la muestra biológica, cuando se toma del paciente, sin alterar la capacidad de unión del anticuerpo anti-HMGB1;
  - c) opcionalmente, medios para cuantificar quimiocinas;
  - d) opcionalmente, un tampón de neutralización;
  - e) opcionalmente, anticuerpos secundarios que se unen con el complejo de HMGB1/anticuerpos específicos; y
  - f) opcionalmente, instrucciones de uso, en particular un prospecto.
14. Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho kit comprende:
- a) proteína HMGB1 nativa o derivados de dicha proteína HMGB1; y
  - b) dicha solución de disociación ácida.
15. Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho kit comprende:
- a) proteína HMGB1 nativa o derivados de dicha proteína HMGB1; y
  - b) medios para cuantificar quimiocinas.
16. Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 13 o 15, donde dicha quimiocina es la quimiocina IP-10 y/o la quimiocina MCP-1.

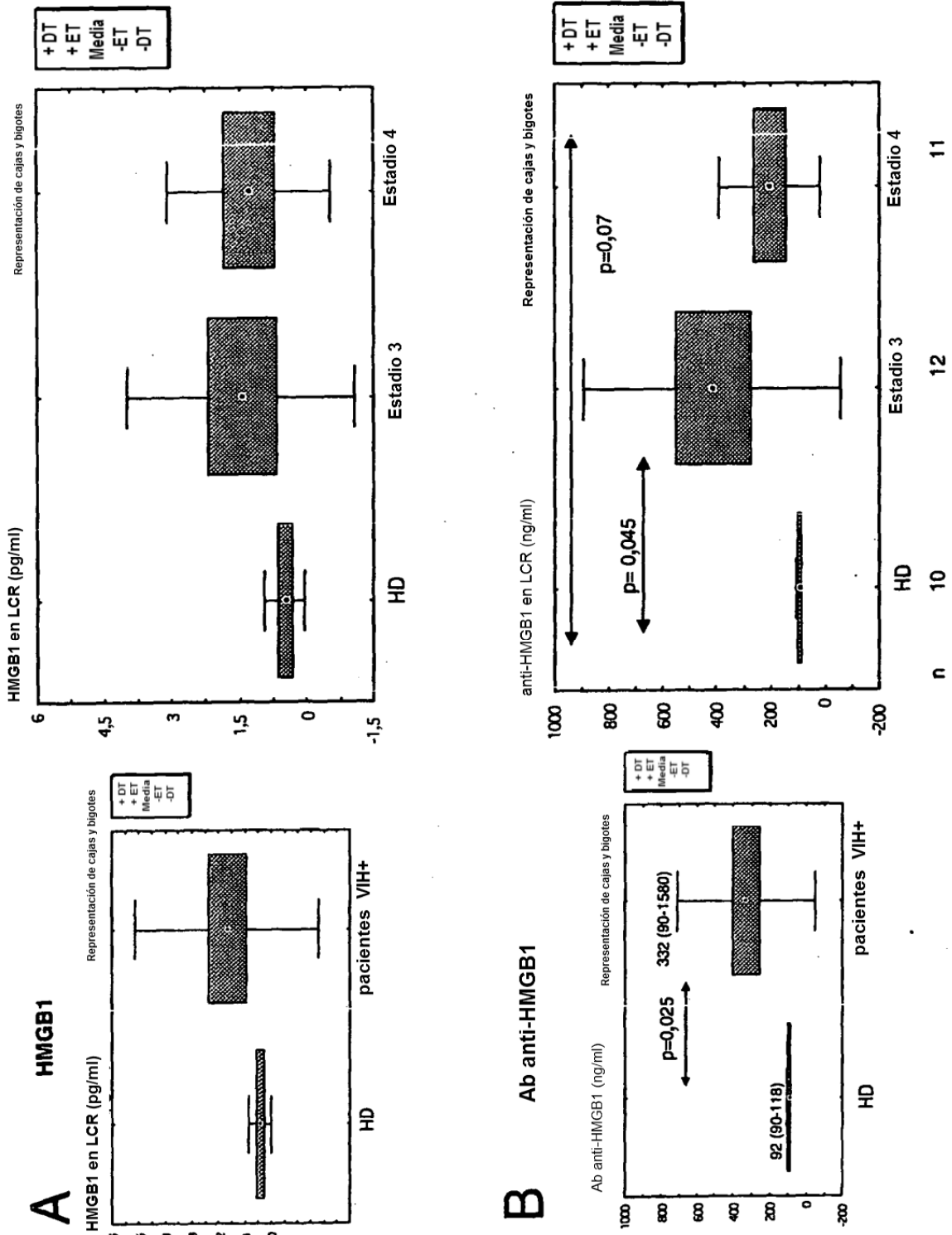


Fig. 1

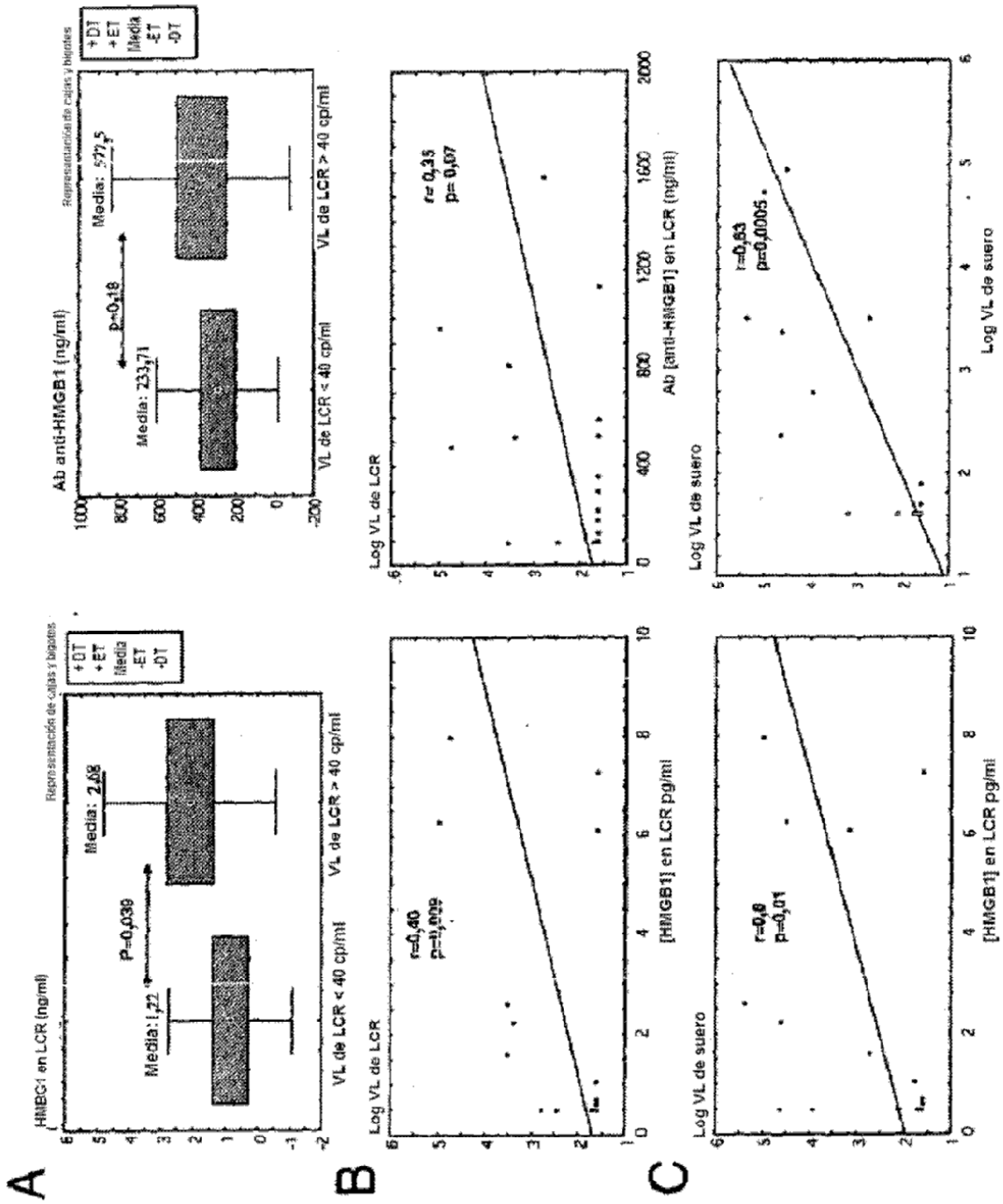
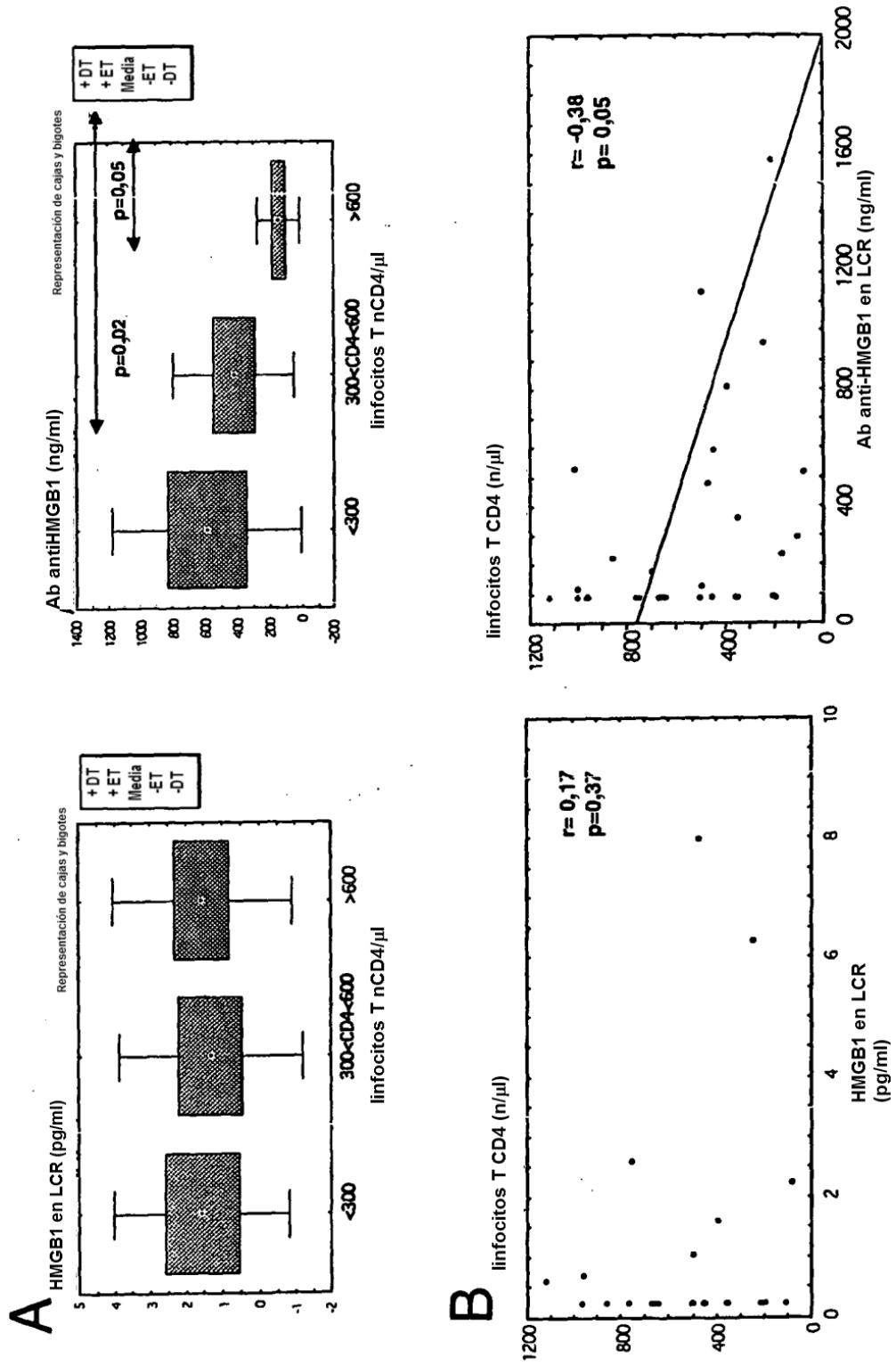


Fig. 2





**Fig. 3**

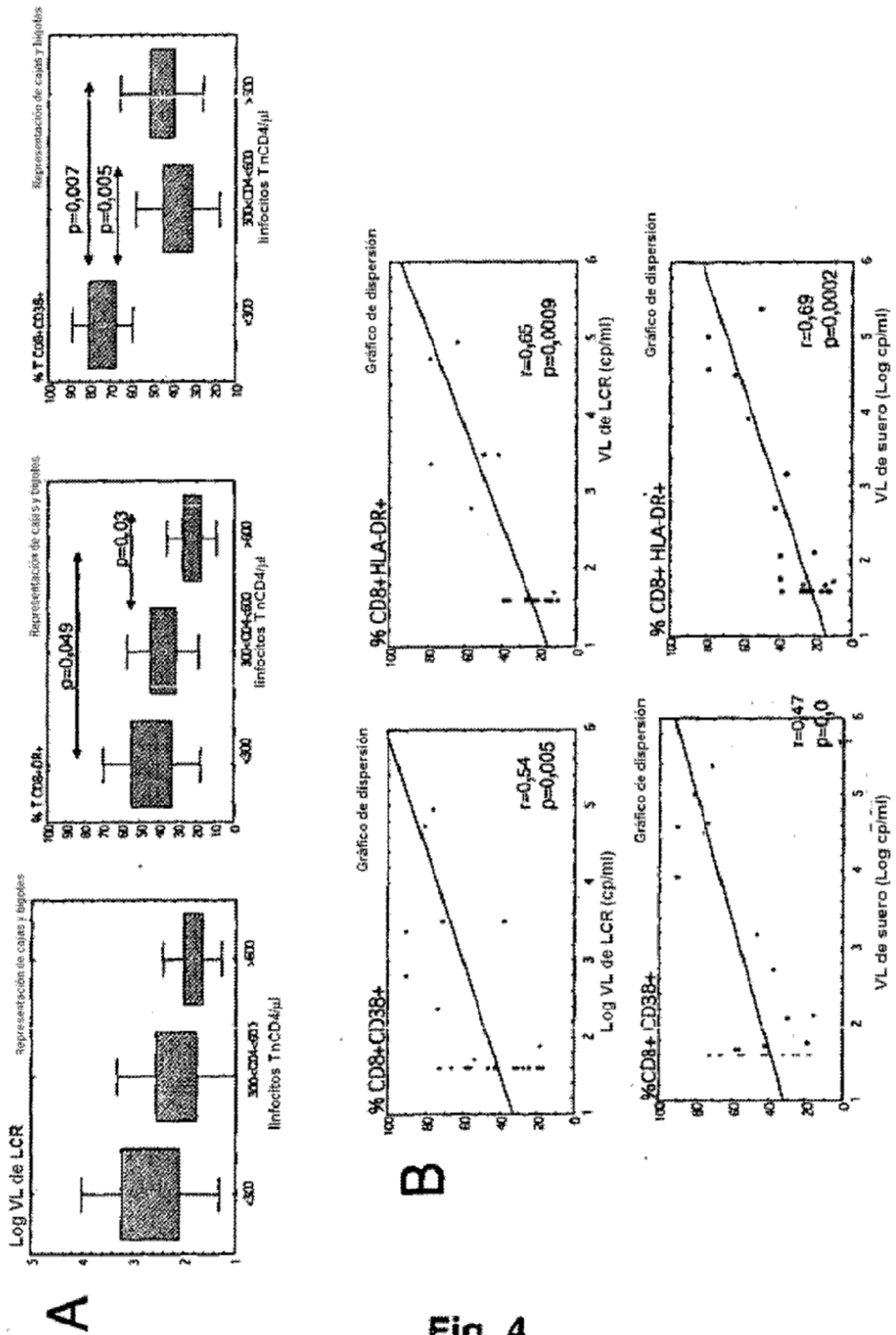


Fig. 4

C

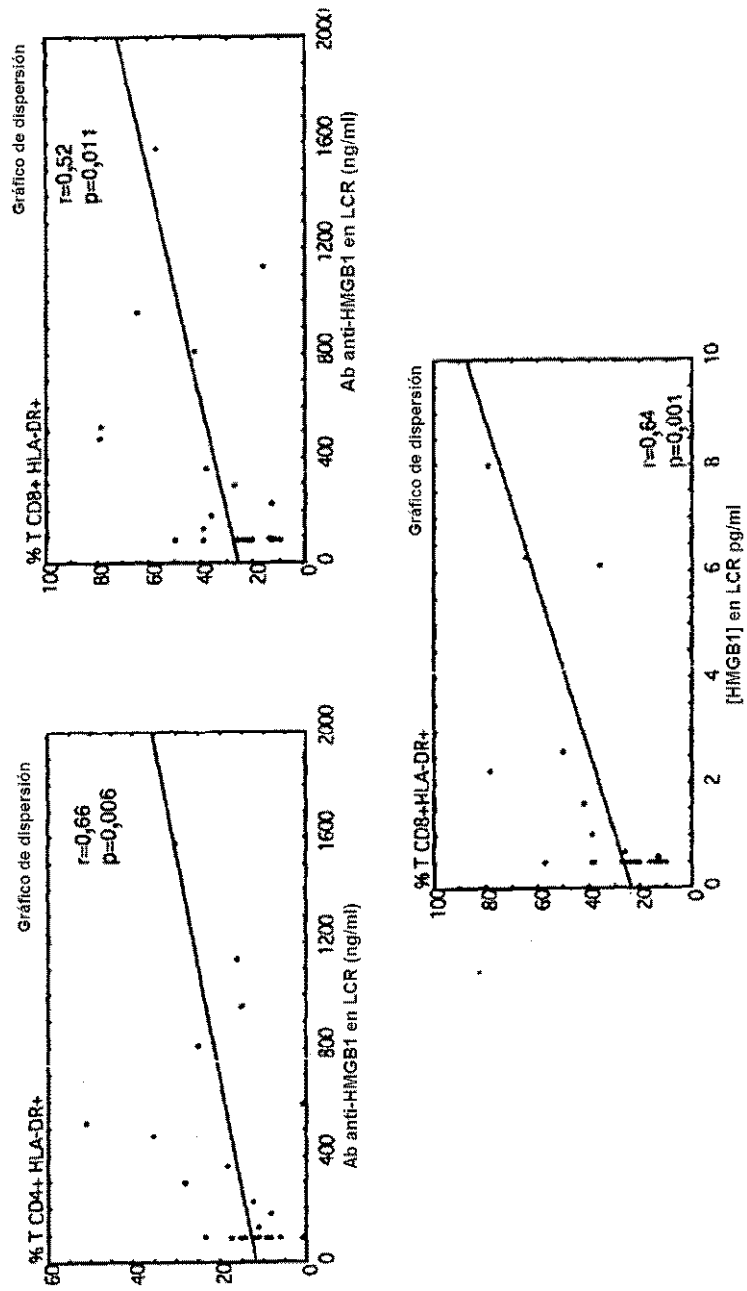


Fig. 4

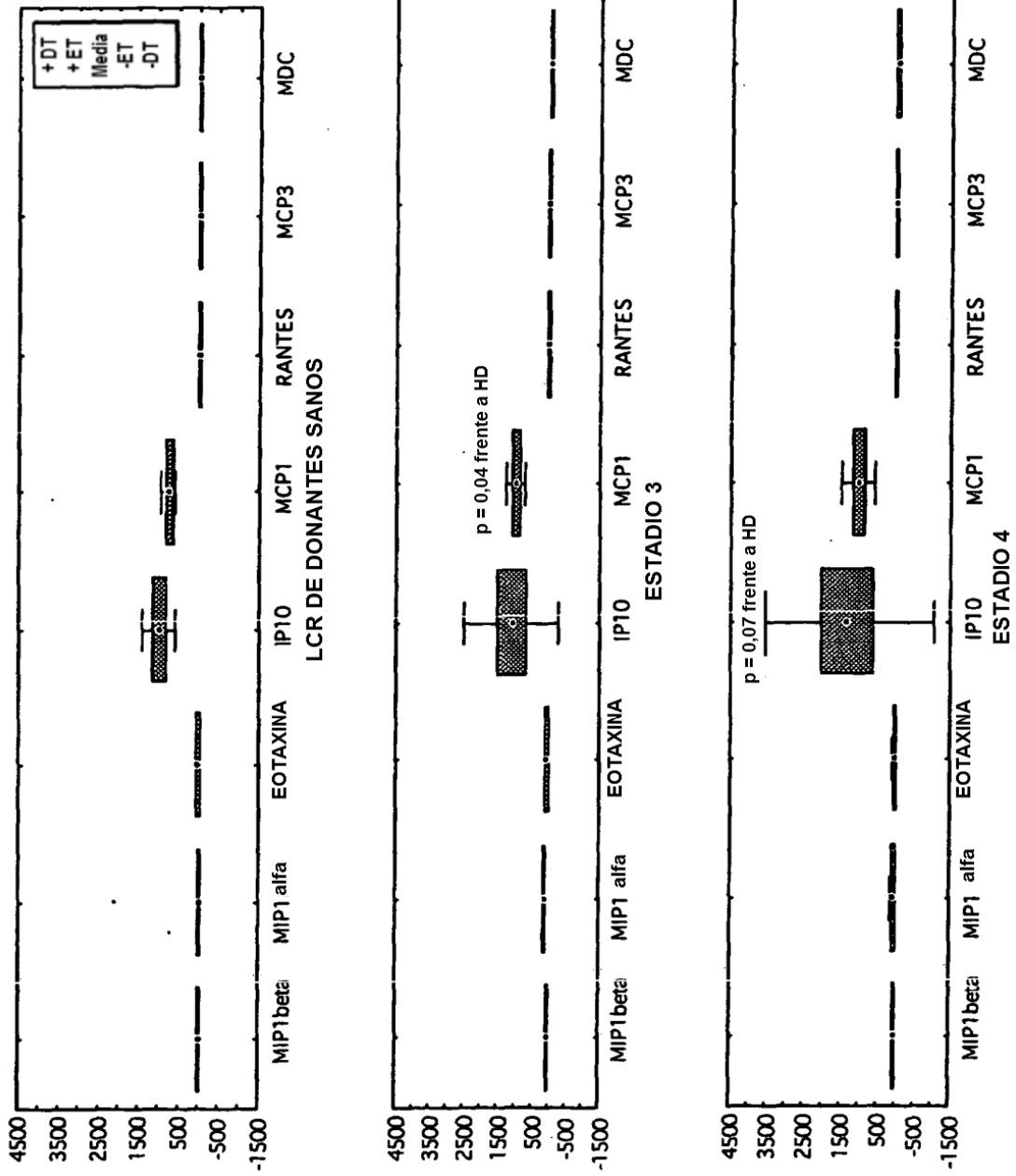
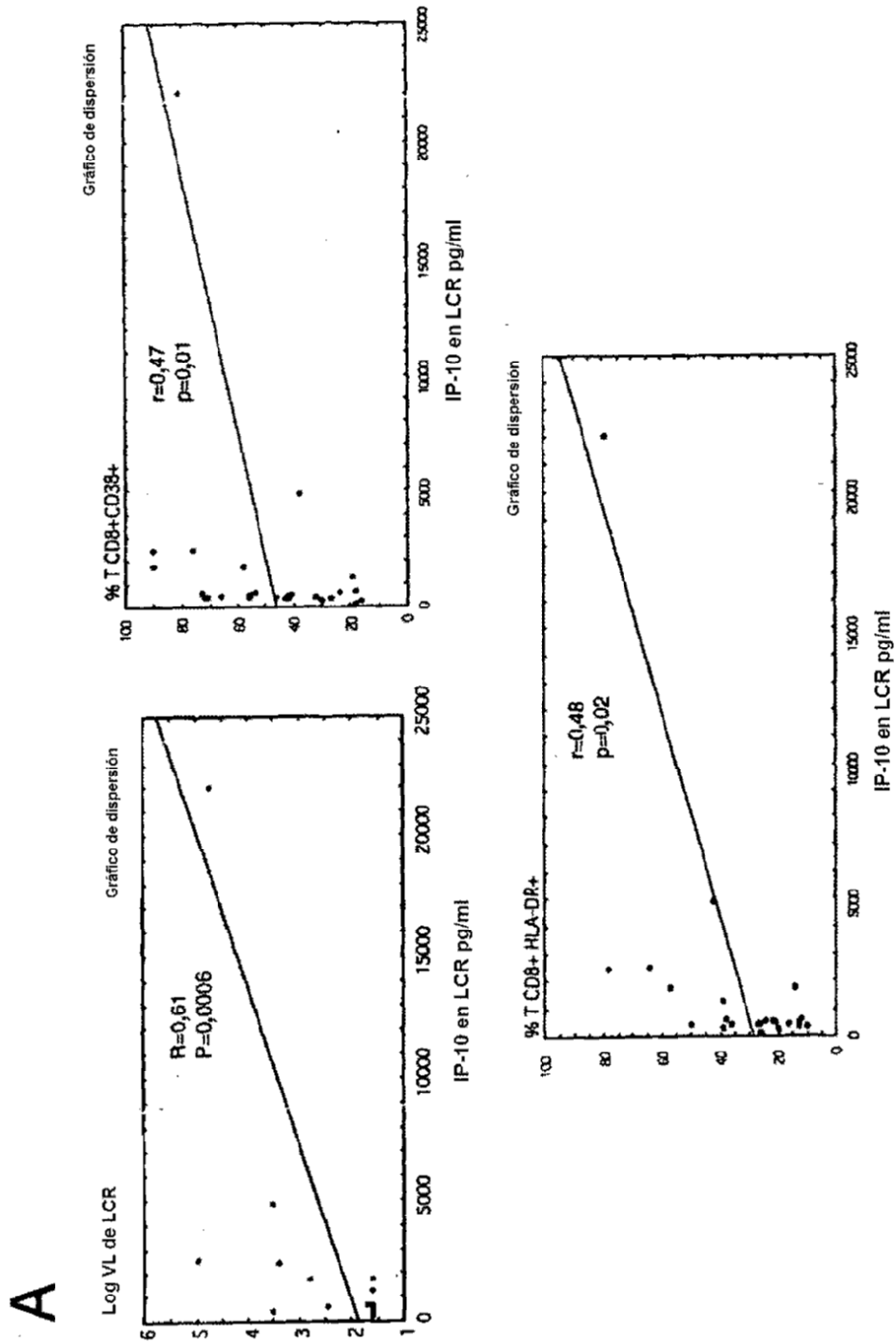


Fig. 5



**Fig. 6**

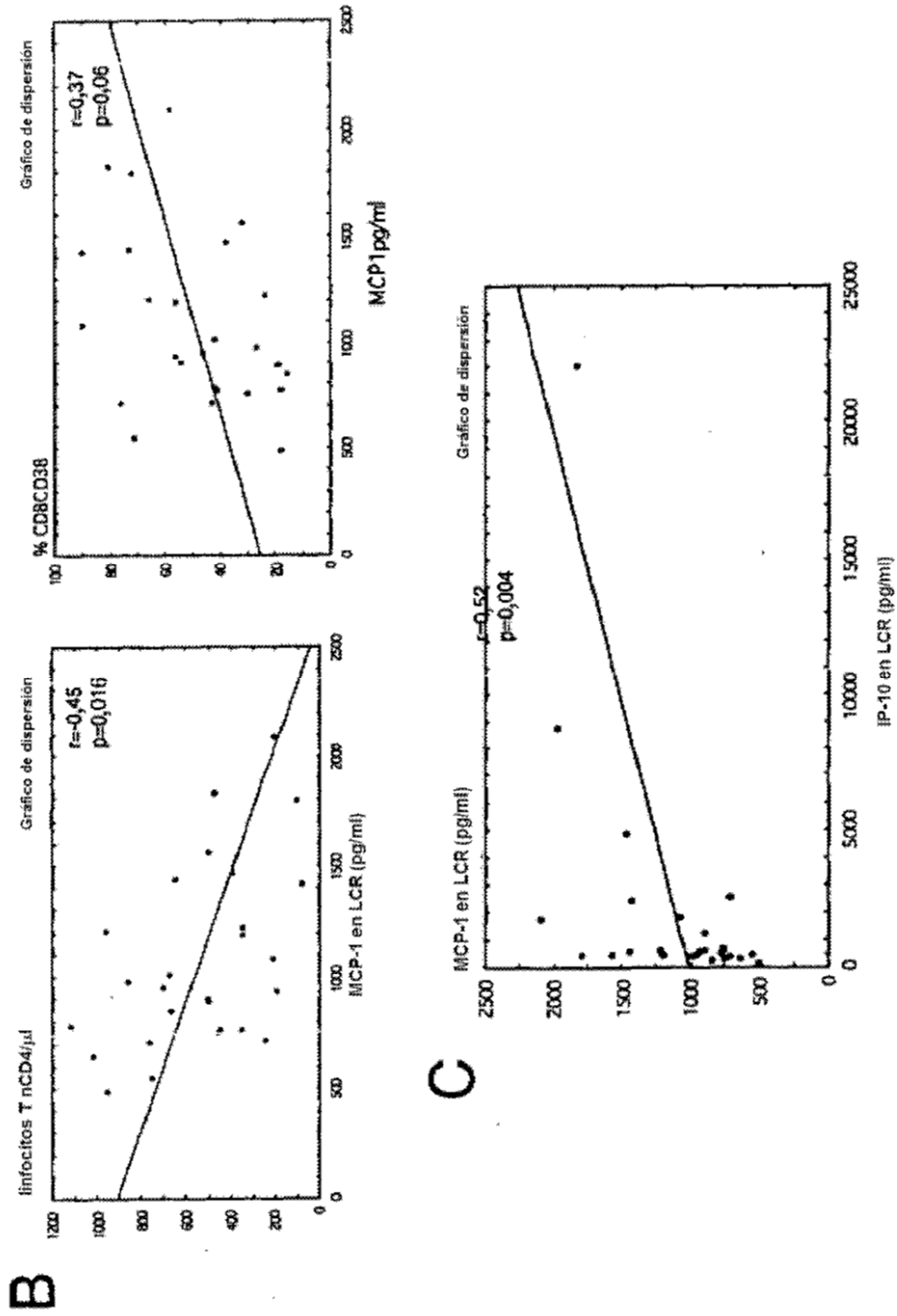
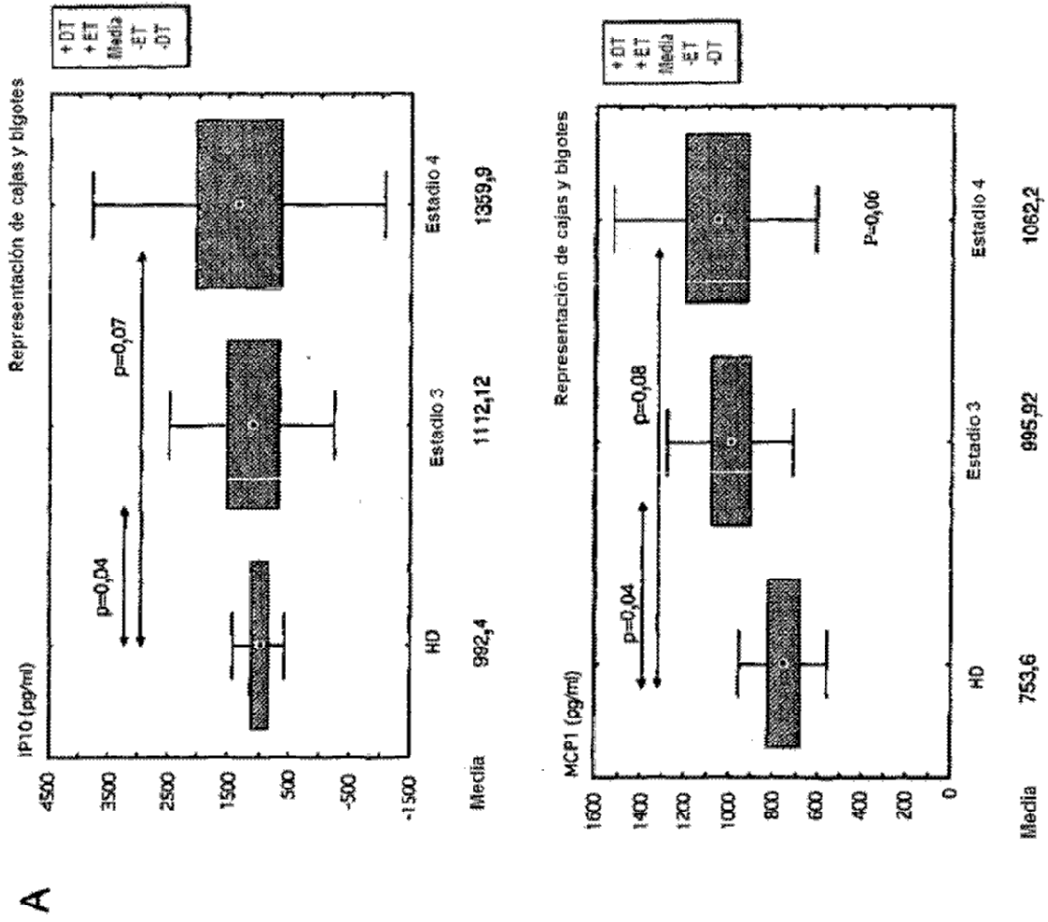
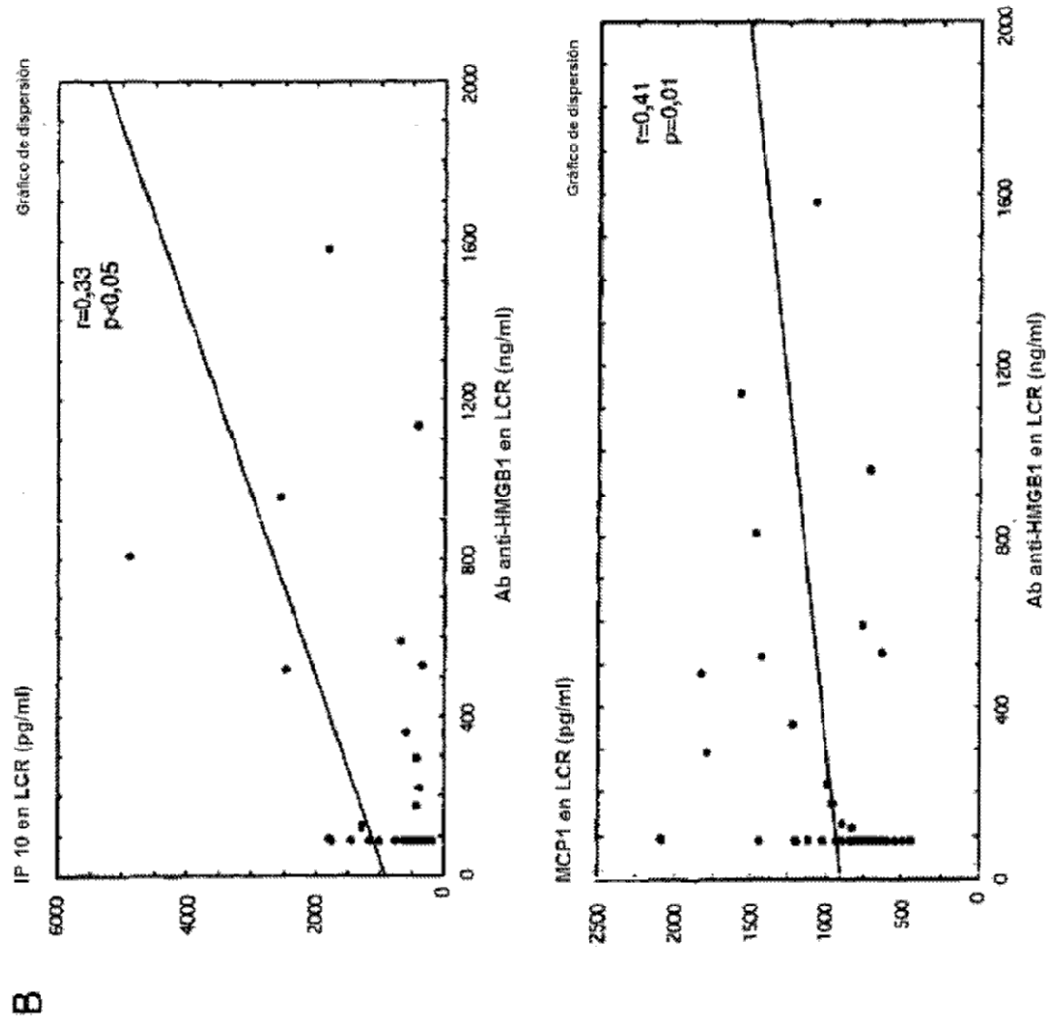


Fig. 6



**Fig. 7**



**Fig. 7**



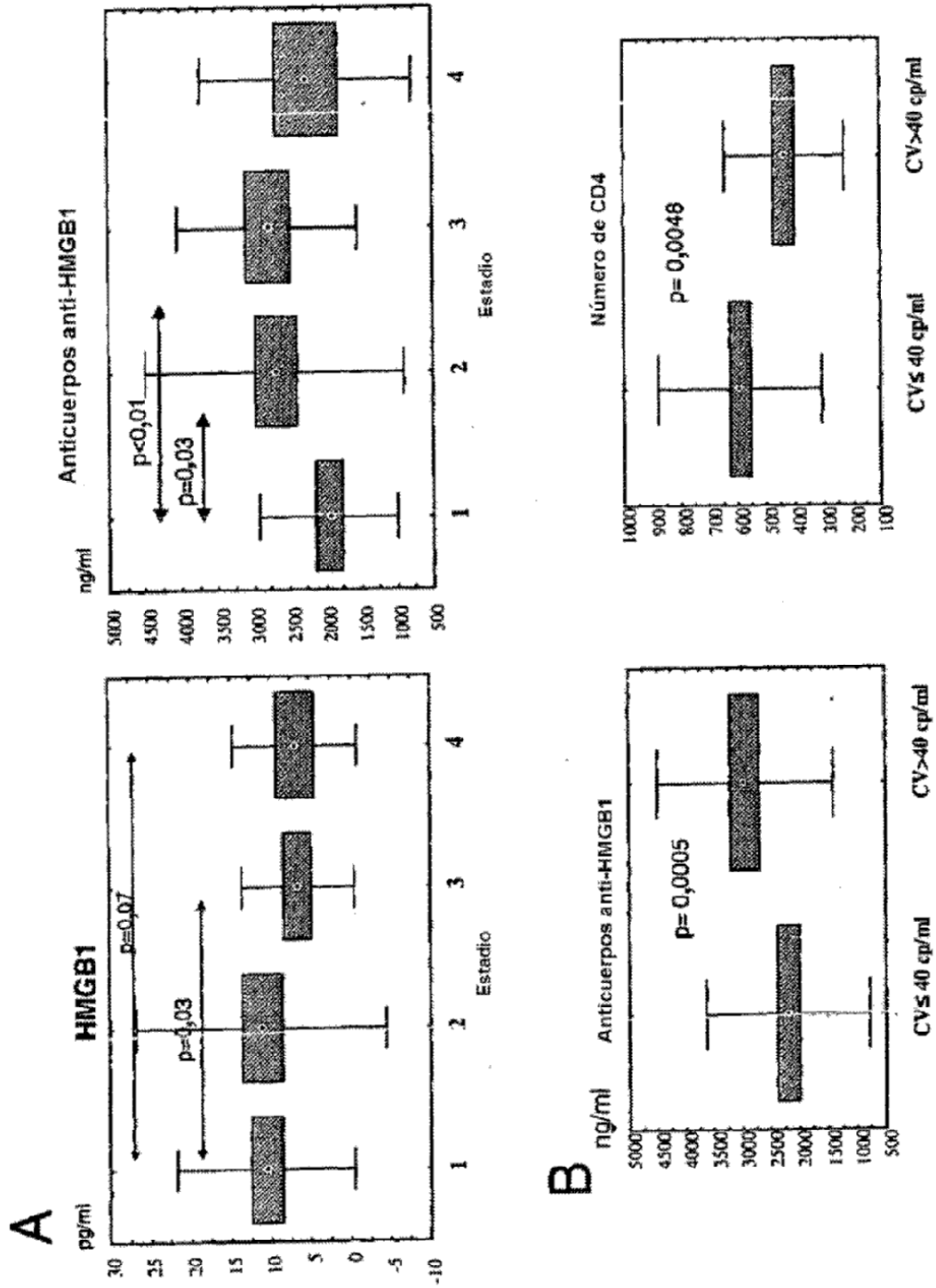
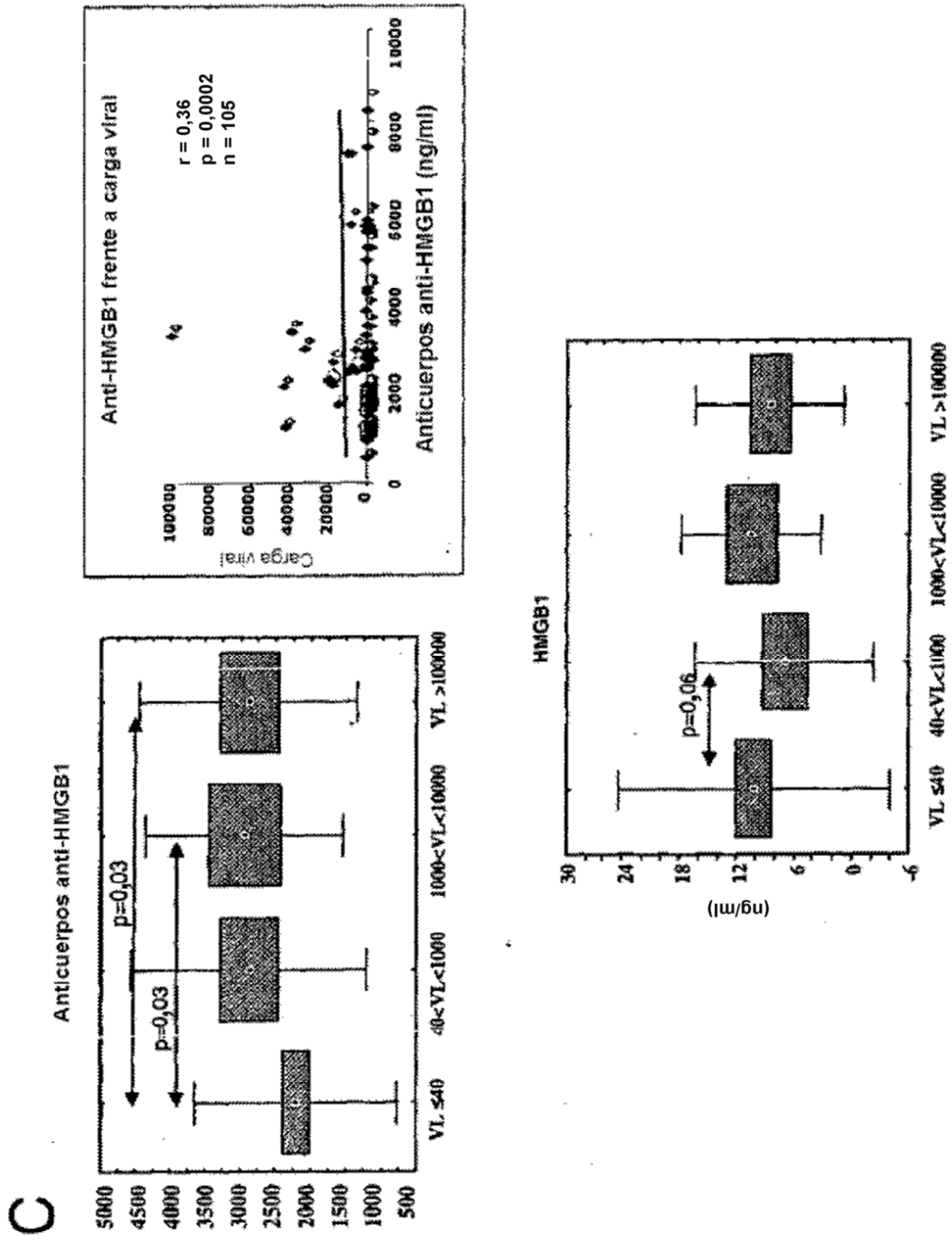


Fig. 8



**Fig. 8**

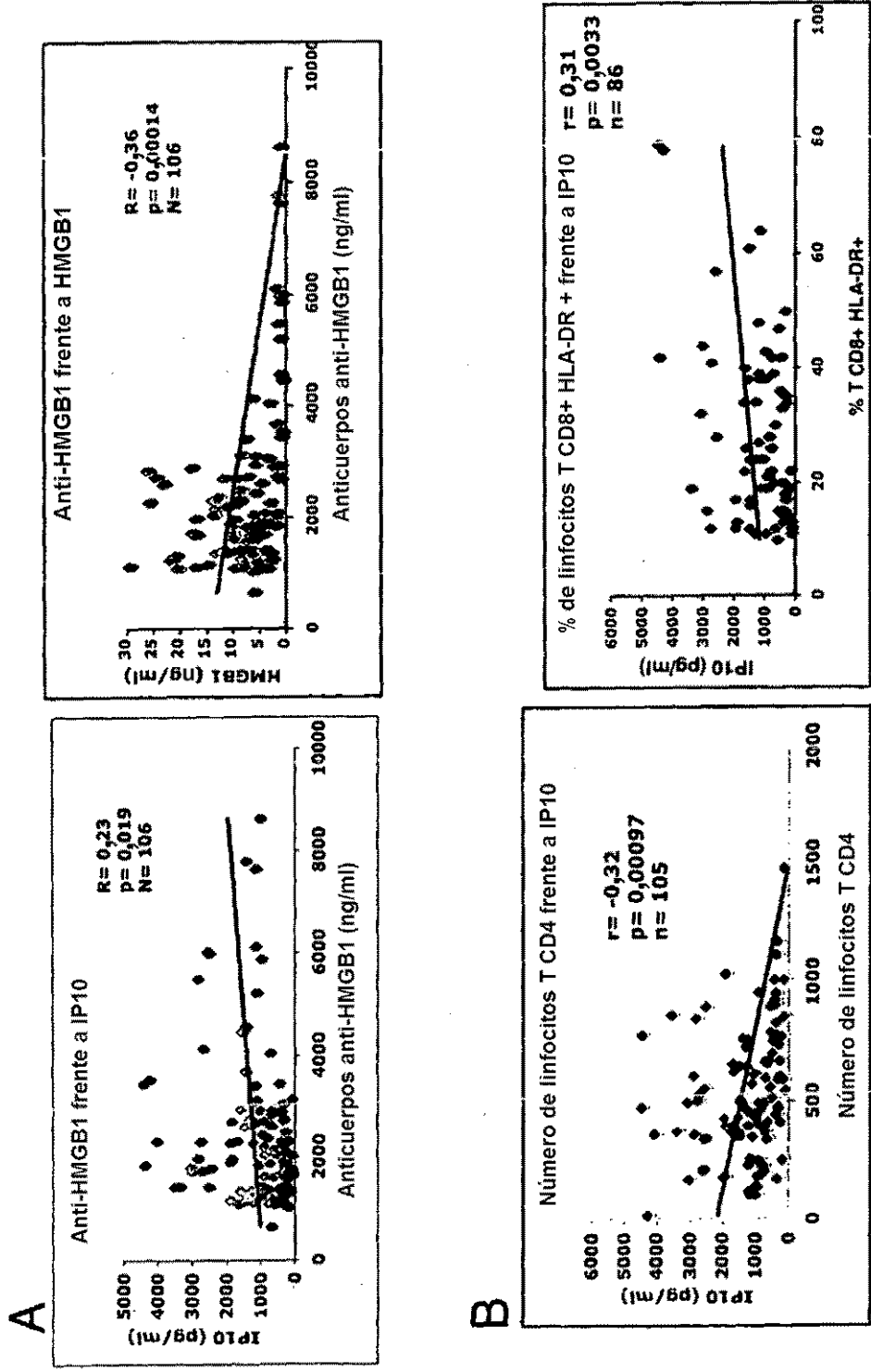
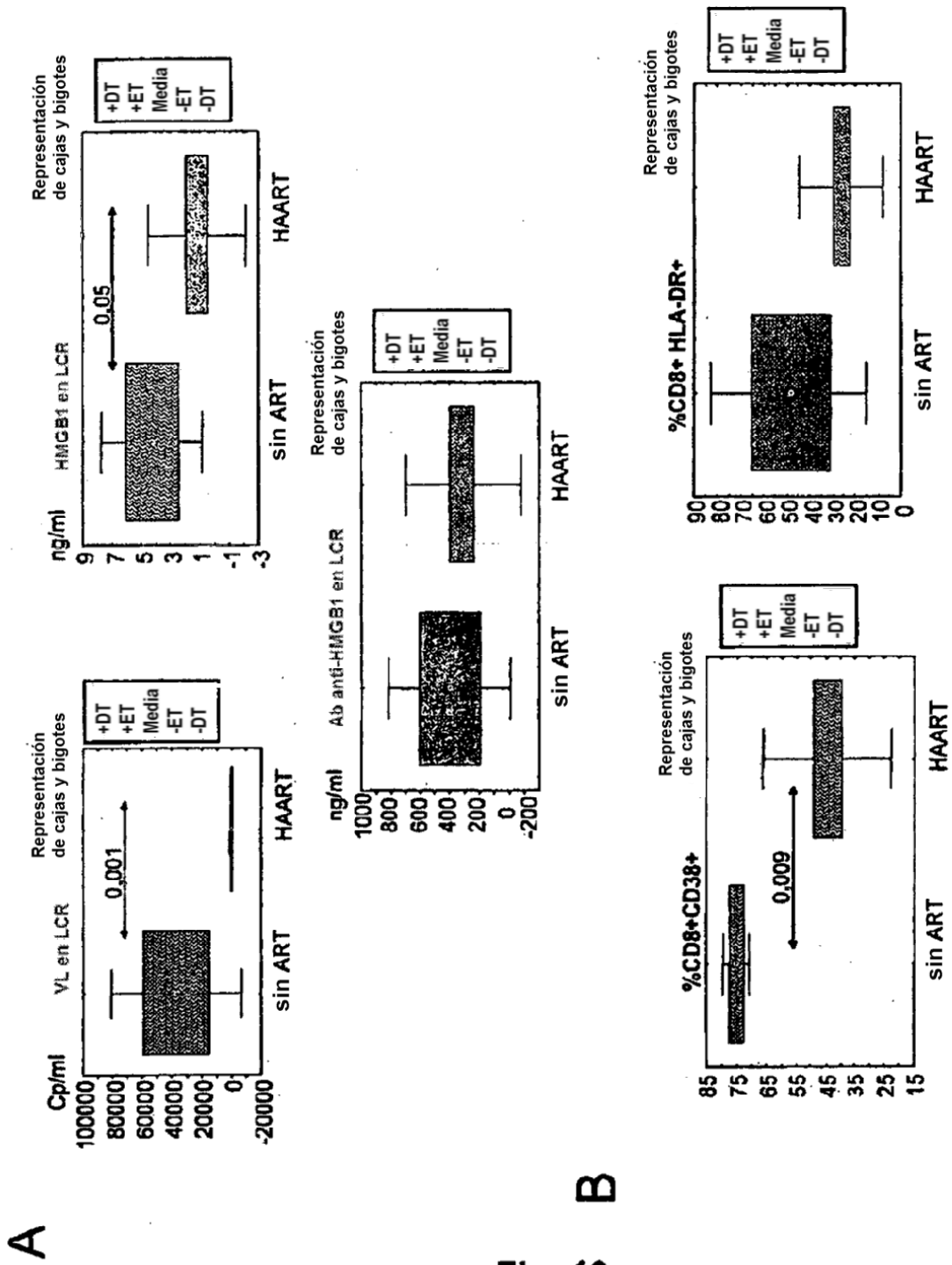
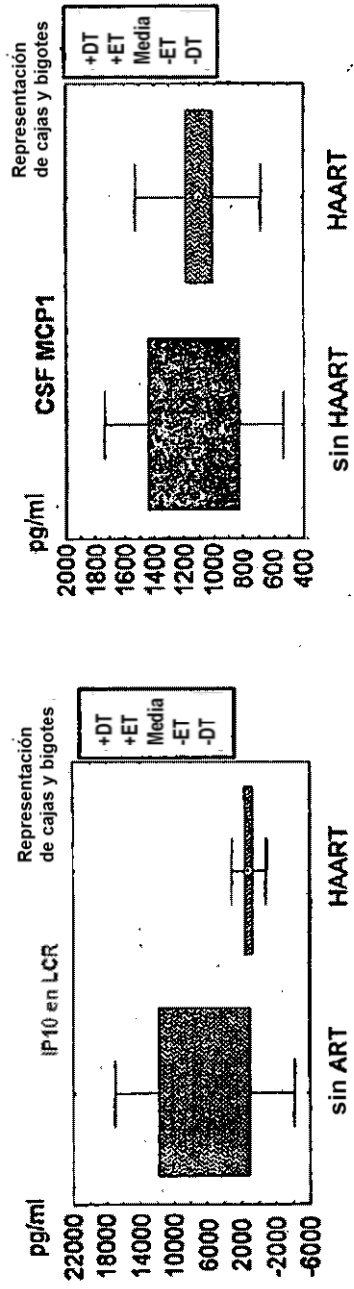


Fig. 9





C

Fig. 10

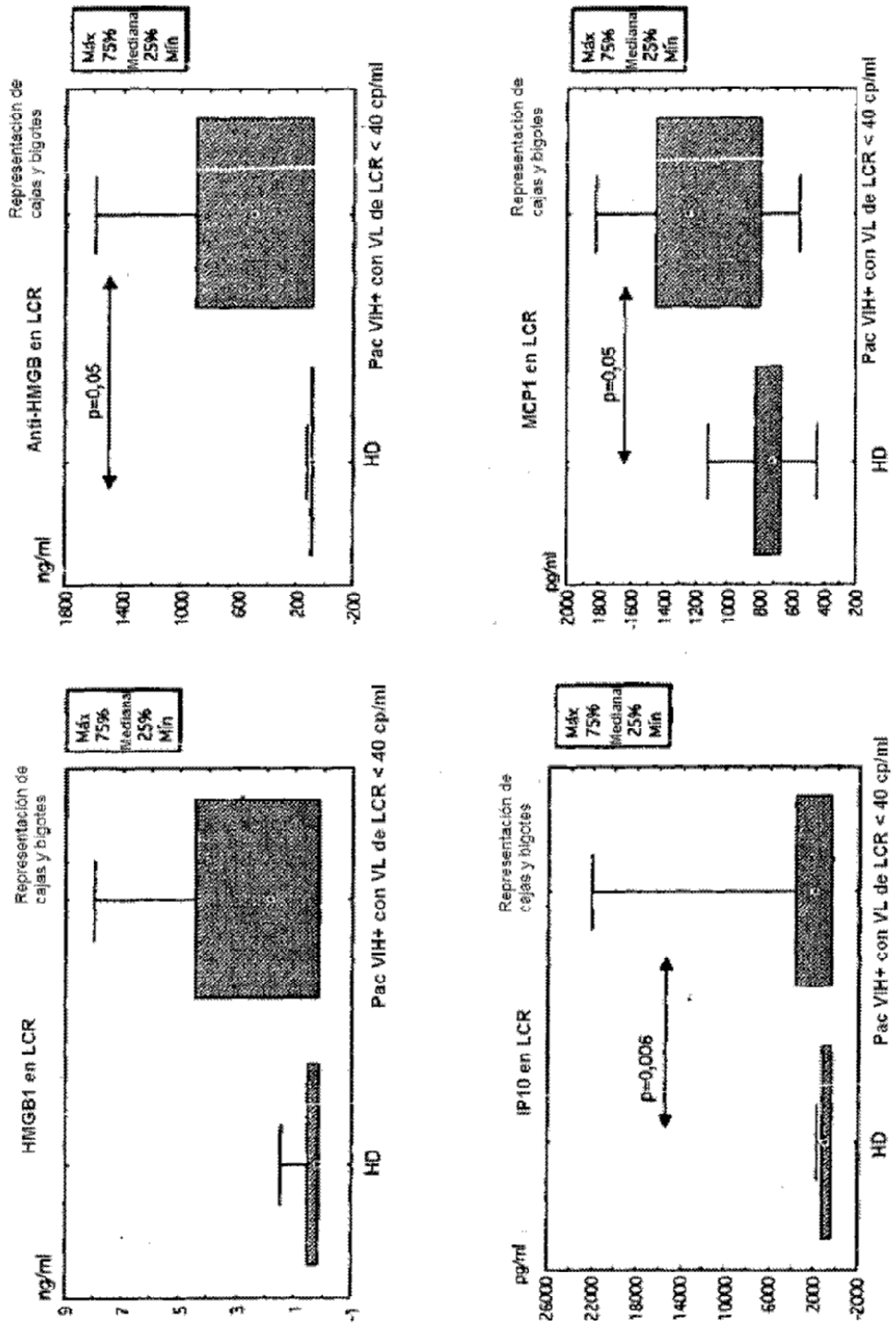
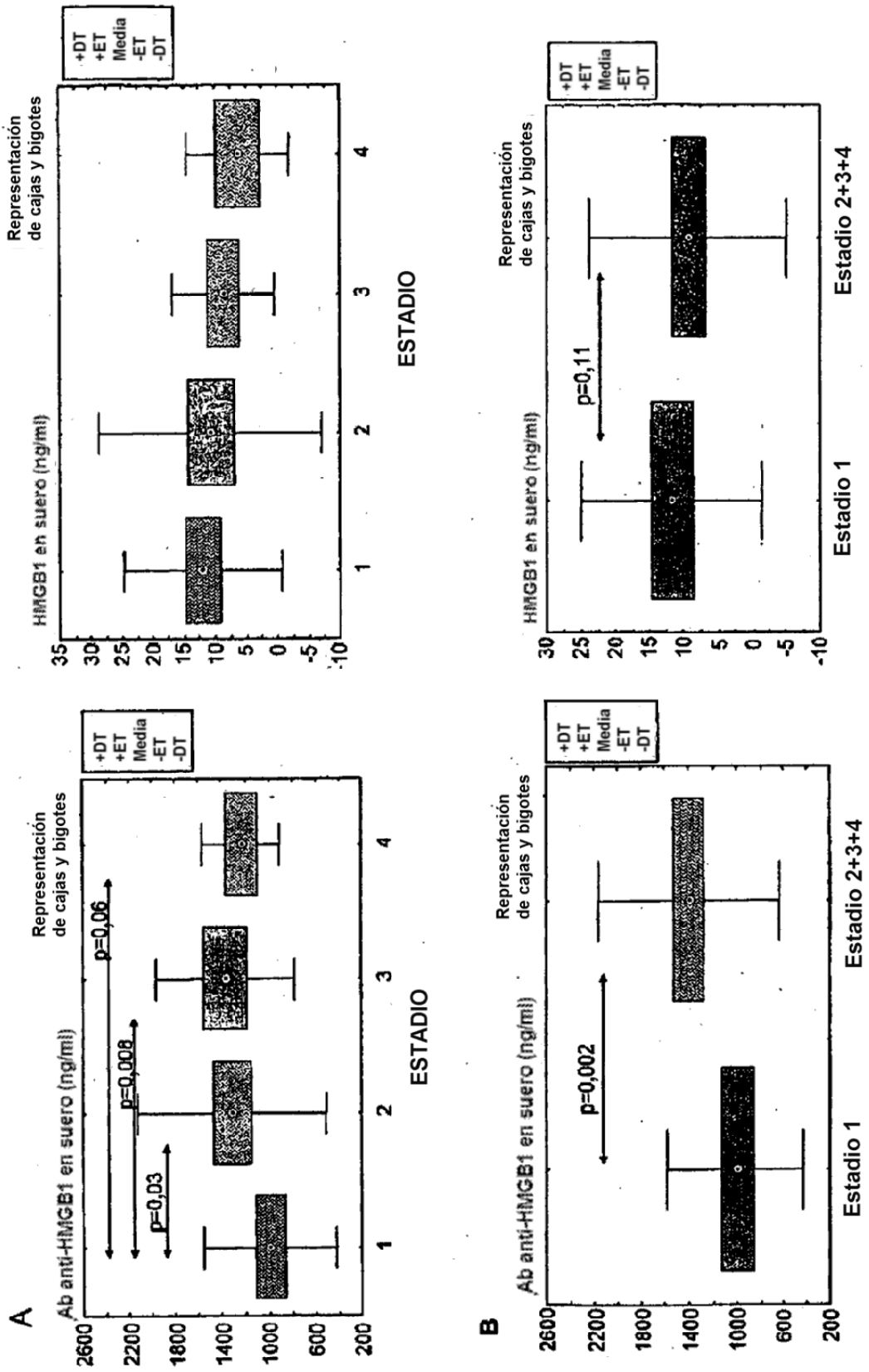
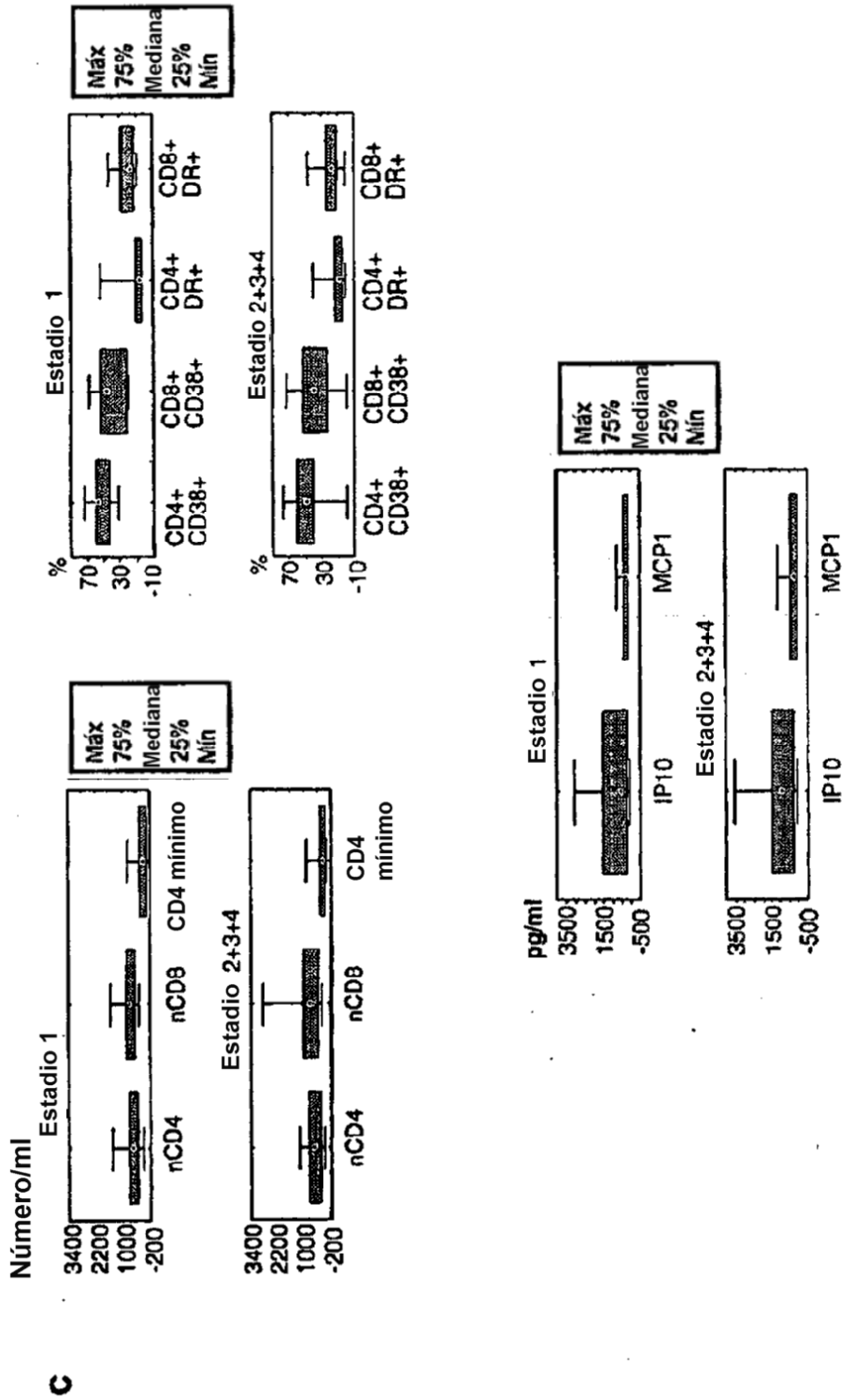


Fig. 11





**Fig. 12**



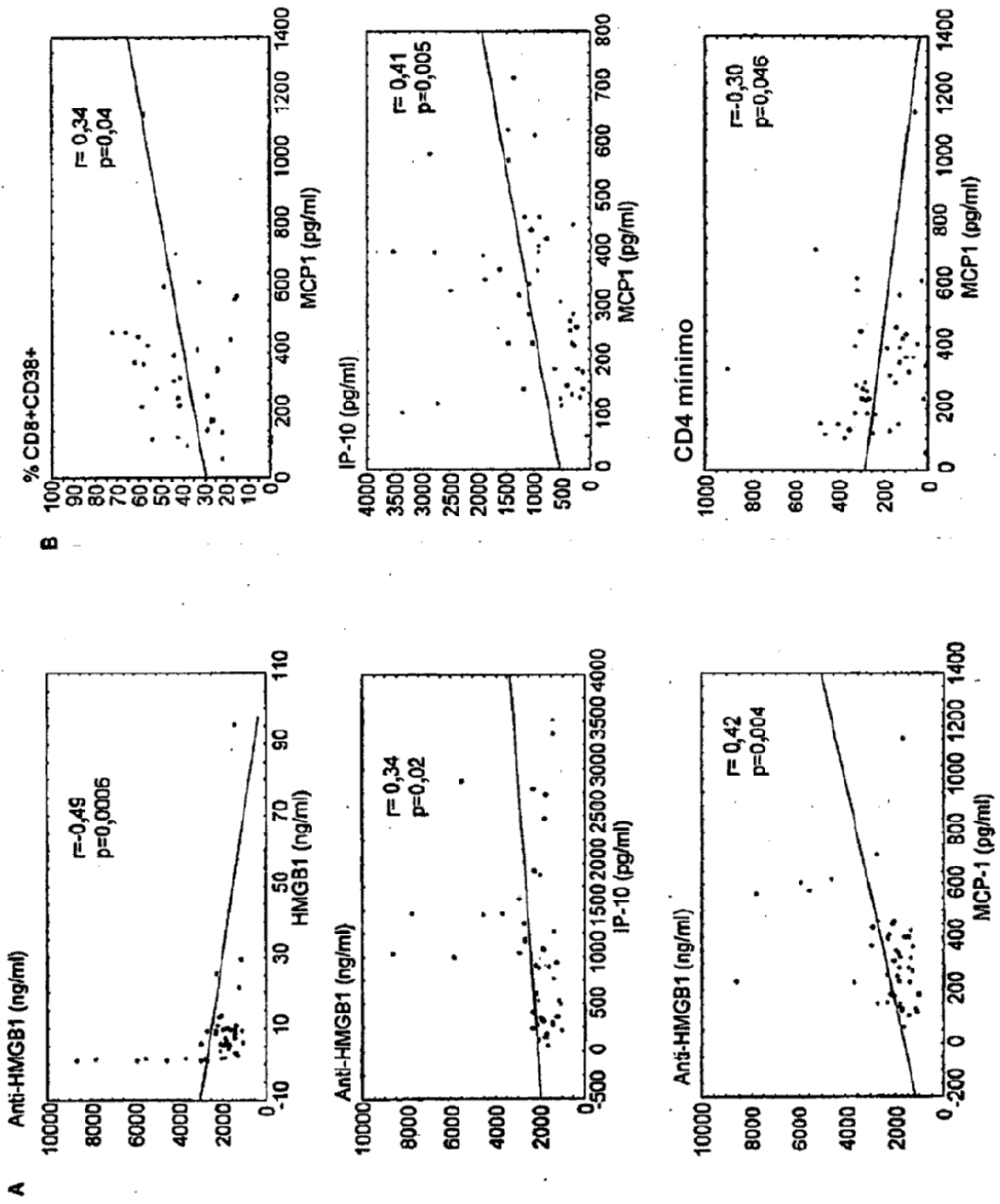
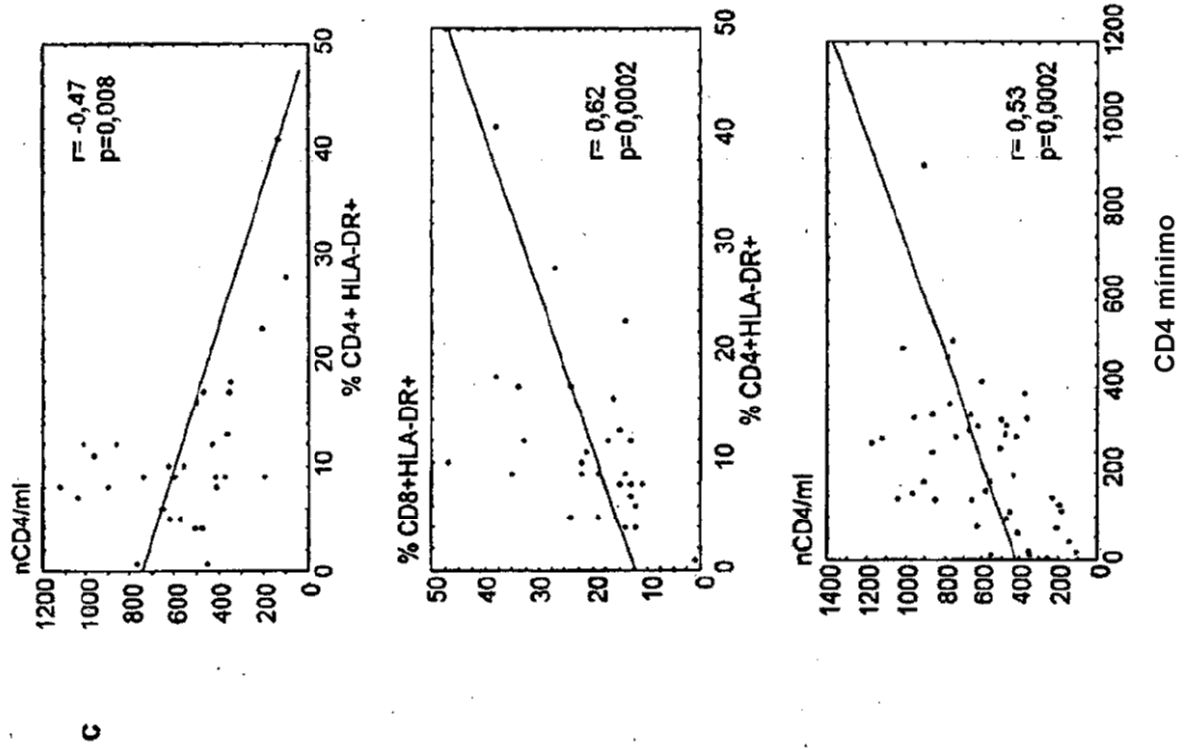


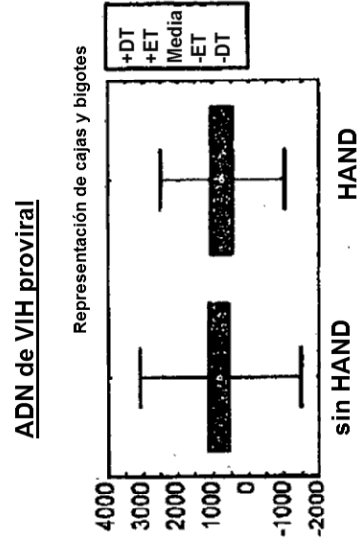
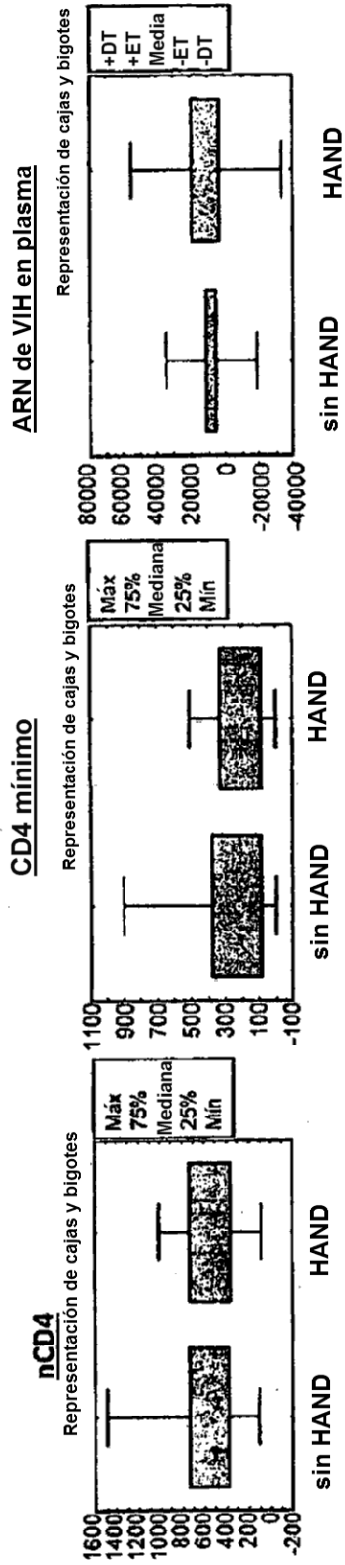
Fig. 13



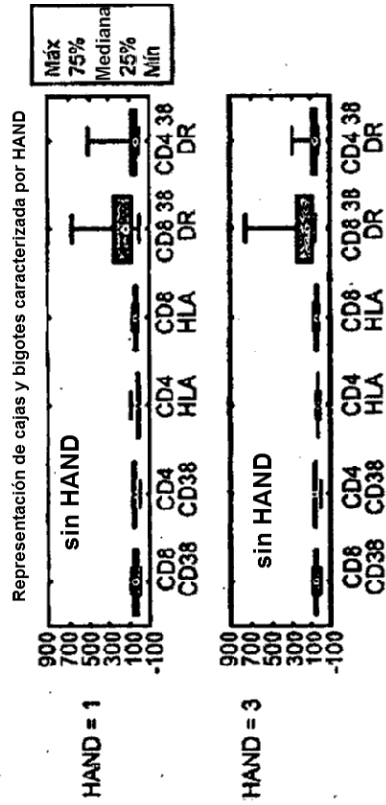
**Fig. 13**

	Todos los pacientes		Sin HAND	HAND	p-valor
	mediana (IQR)	mediana (IQR)	mediana (IQR)	mediana (IQR)	HAND frente a sin HAND
Número de pacientes	103	73	30		/
ARN de VIH (log <sub>10</sub> copias/ml) en inclusión	1,6 (1,6-2,41)	1,6 (1,6-2,62)	1,6 (1,6-2,08)		NS
Recuento de CD4 (células/mm <sup>3</sup> ) recuento de CD4 mínimo (células/mm <sup>3</sup> )	495 (357-741) 216 (75-350)	480 (372-729) 216 (78-372)	499 (351-754) 207 (58-340)		NS NS
Con terapia anti-retroviral (n, %) Virémico (n, %)	86 (81 %) 34 (33 %)	59(81 %) 23 (31 %)	24 (80 %) 11 (36 %)		NS NS
% T CD8 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> % T CD4 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	13,4 (7,1-25,2) 4,2 (2,8-8,4)	13,6 (7-25,6) 3,75 (2,7-8,4)	13,4 (7,7-24,3) 4,9 (3,2-7,7)		NS NS
HMBG1 en circulación (ng/ml) anti-HMBG1 total (ng/ml) IP10 (pg/ml) MCP1 (pg/ml)	6,29 (3,4-10,8) 1188 (848-1855) 953 (405-1533) 267 (195-400)	7,4 (5,2-11,6) 1166 (808-1696) 969 (375-1666) 261 (198-374)	3 (1,6-10) 1285 (1047-2134) 832 (534-1359) 292 (179-462)		0,006 0,05 NS NS

**Fig. 14**

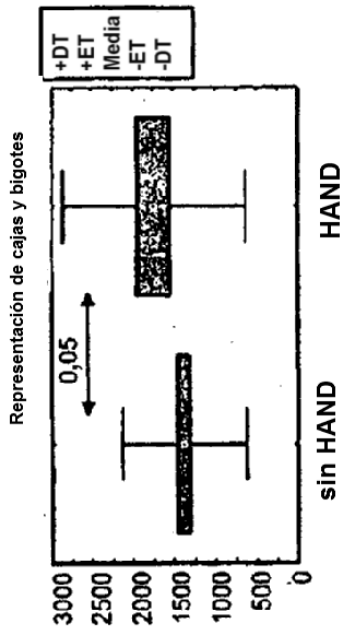


**Marcadores de activación**

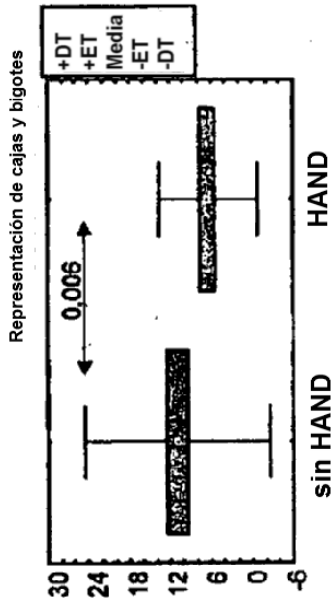


**Fig. 15**

**Ab anti-HMGB1**

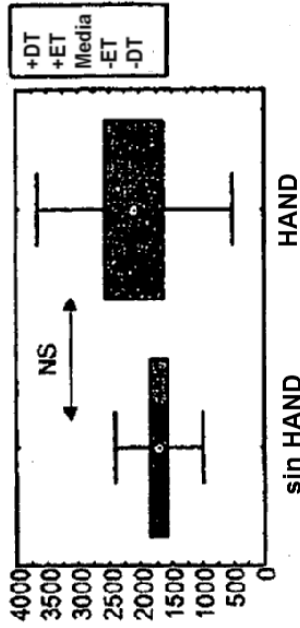


**HMGB1**



Todos los pacientes

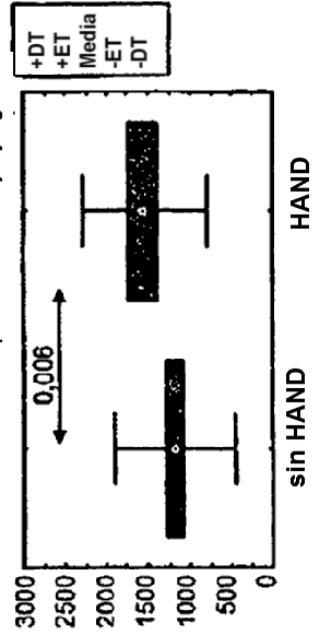
Representación de cajas y bigotes



Virémico  
(VL > 40 copias/ml)

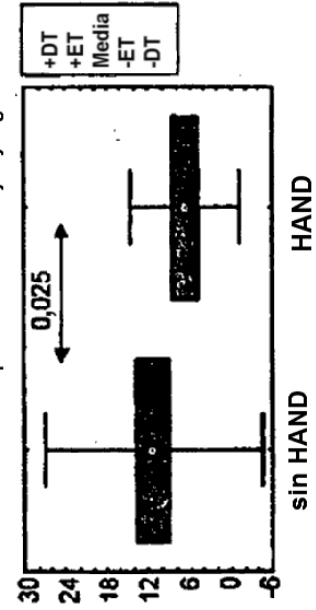
**Fig. 16**

Representación de cajas y bigotes



Avirémico  
(VL < 40 copias/ml)

Representación de cajas y bigotes



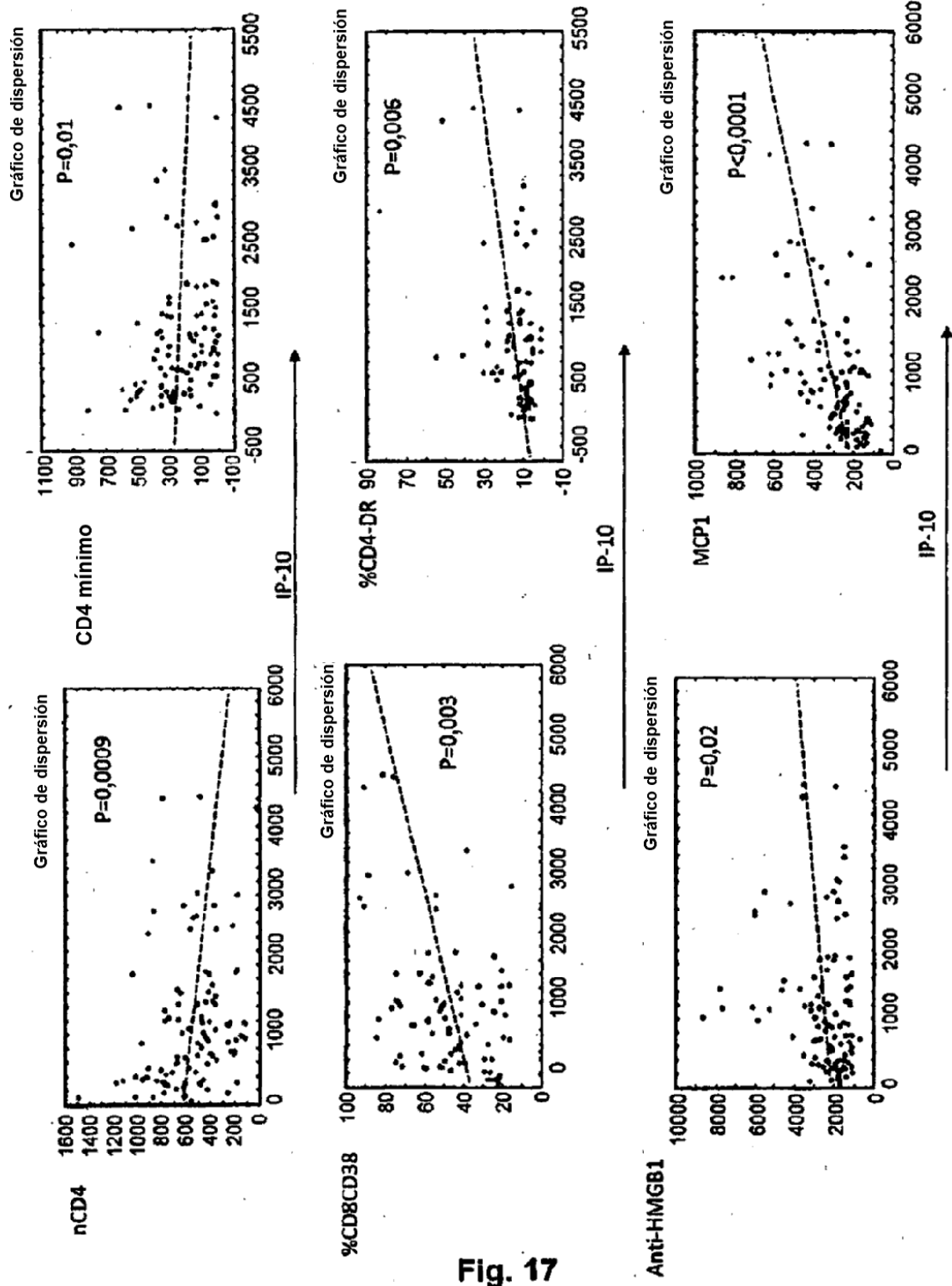


Fig. 17

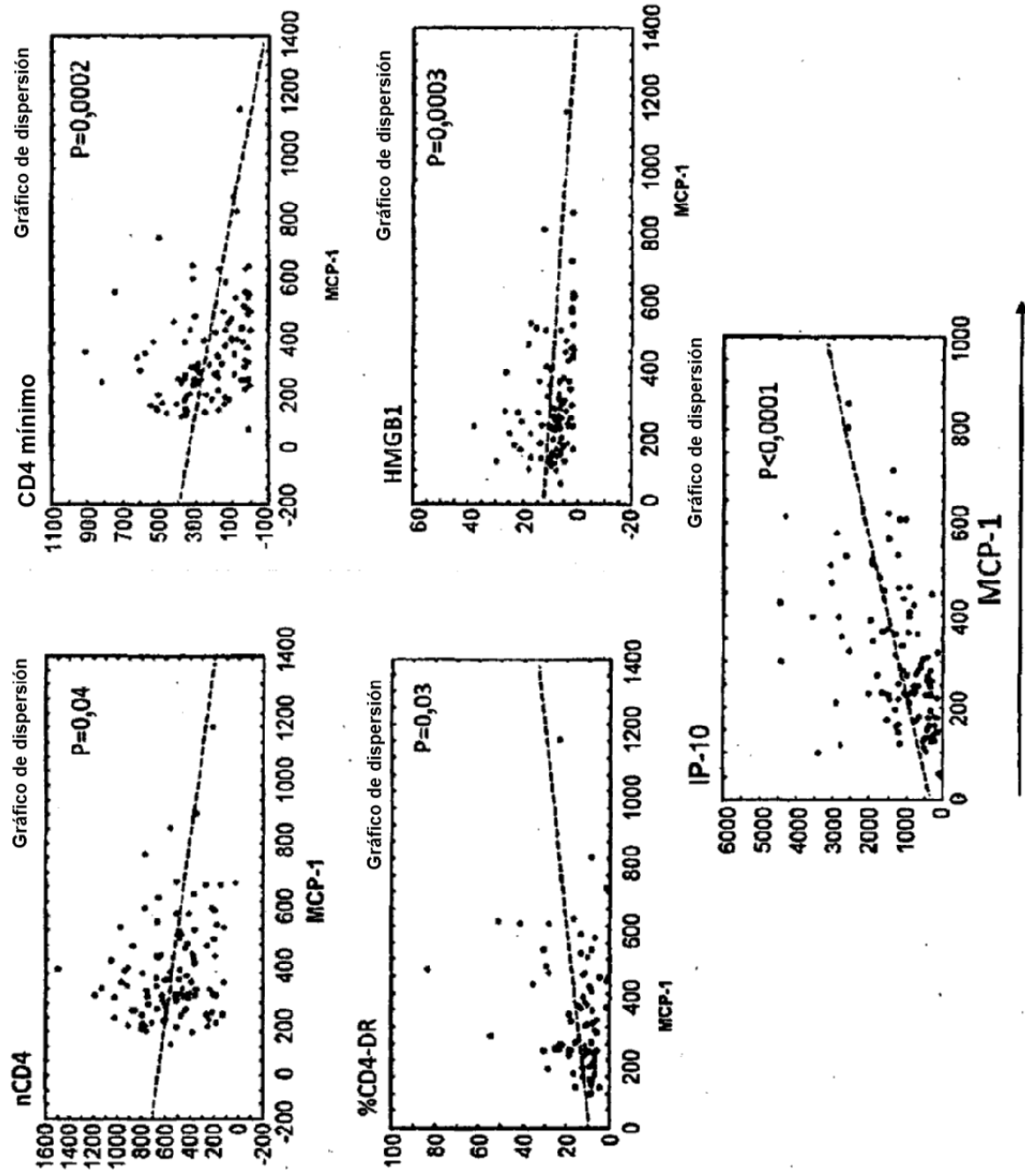


Fig. 18

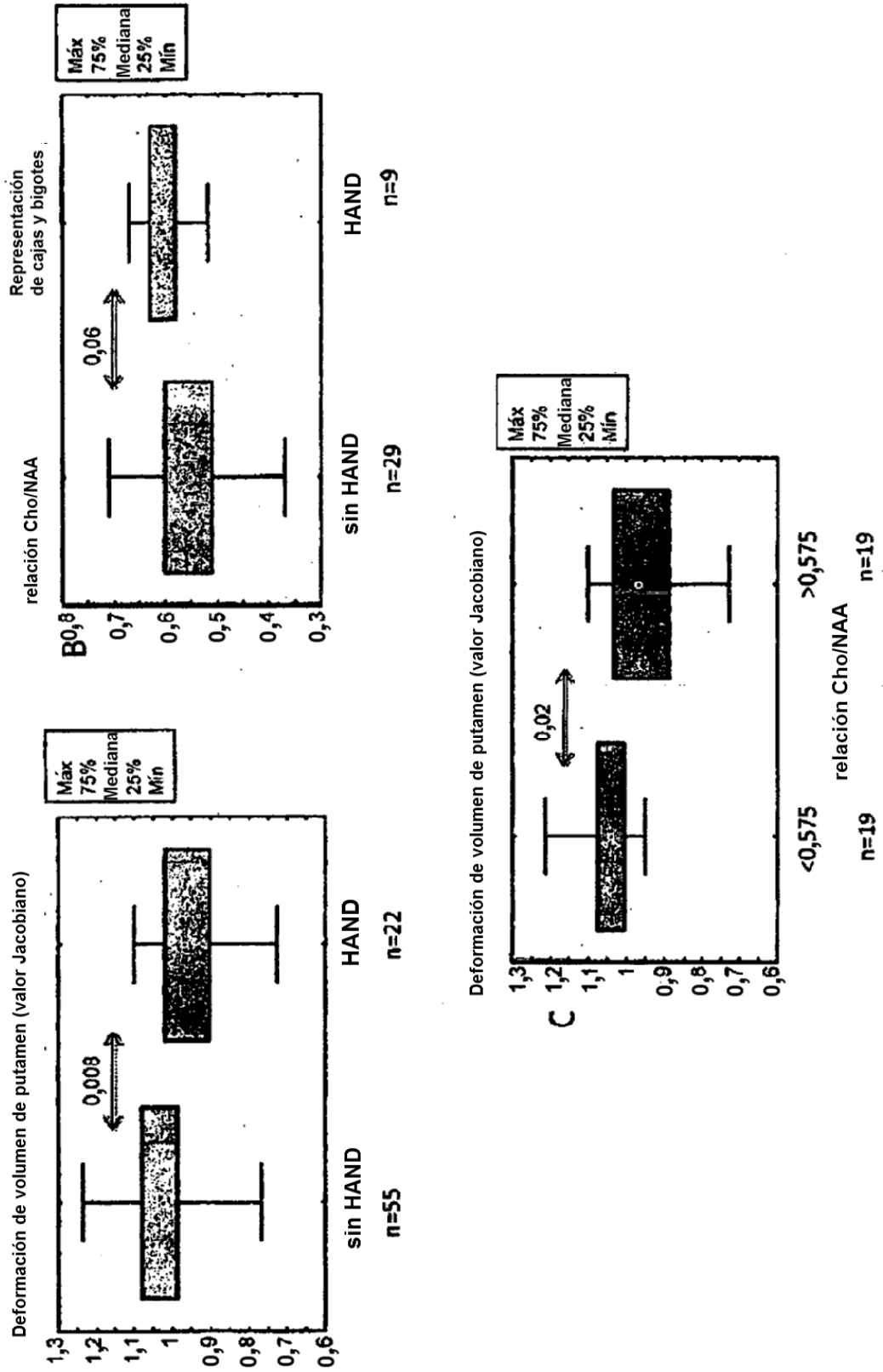


Fig. 19



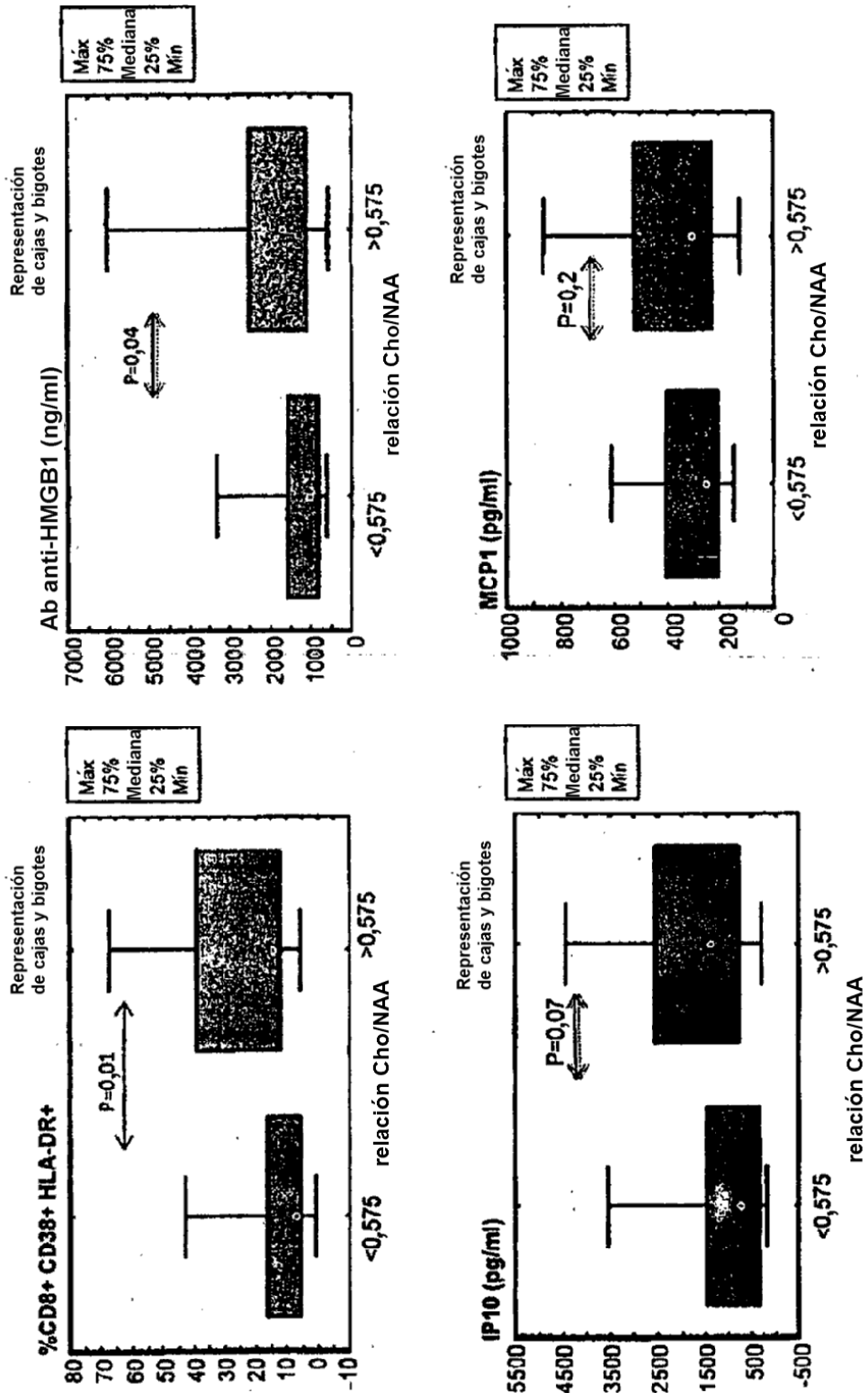


Fig. 20