

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 639**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2012 PCT/IB2012/050787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12114272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2012 E 12707649 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2678683**

54 Título: **Un método para el pronóstico de progreso de la enfermedad por VIH**

30 Prioridad:

22.02.2011 EP 11305187

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

28.02.2017

73 Titular/es:

**INNAVIRVAX (50.0%)
Génopole Entreprises Campus 1 4 rue Pierre
Fontaine
91058 Evry, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MEYER, LAURENCE;
VIEILLARD, VINCENT;
DEBRE, PATRICE y
CROUZET, JOËL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 603 639 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

Un método para el pronóstico de progreso de la enfermedad por VIH.

La presente invención se refiere al campo de pronóstico de la enfermedad por VIH.

5 La infección de los seres humanos con un virus VIH se diagnostica, en general, por inmunodetección de anticuerpos anti-VIH en muestras de plasma sanguíneo. Numerosos estuches de prueba ELISA de VIH están comercialmente disponibles hoy en día. En general, los estuches de prueba ELISA de VIH conocidos usan tiras de micropozos de poliestireno que están prerrecubiertas con una mezcla de antígenos de VIH, antígenos de VIH que pueden consistir en antígenos de VIH recombinantes expresados en *E. coli*, tales como glucoproteínas VIH-1 gp41, gp120 y VIH-2 gp36 recombinantes.

10 Una vez que se ha diagnosticado la infección de un individuo con un virus VIH, se realizará un seguimiento del progreso de la enfermedad por VIH, incluyendo para el fin de determinar cuándo empezar un tratamiento farmacéutico antirretroviral (TAR). Esto requiere realizar un método de estadificación de VIH en dicho individuo.

15 Los sistemas de estadificación y clasificación de la enfermedad por VIH son herramientas críticas que proporcionan a médicos y pacientes información esencial para tratamiento clínico. En la actualidad hay dos sistemas de clasificación principales en uso, respectivamente (i) el sistema de estadificación clínica y clasificación de la enfermedad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y (ii) la clasificación de los centros estadounidenses para el control y la prevención de la enfermedad (CCE).

20 El sistema de estadificación clínica y clasificación de la enfermedad de la OMS de VIH/SIDA se basa principalmente en la determinación de la aparición de episodios clínicos sin el requerimiento obligado de los resultados de análisis de laboratorio. Se ha usado extensamente el sistema de estadificación clínica de la OMS en países de recursos limitados y se ha demostrado pragmático y útil en las instalaciones tanto al primer nivel como al nivel de referencia.

25 El sistema de estadificación de enfermedad de los CCE valora la gravedad de la enfermedad por VIH por recuentos de células linfocíticas T CD4+ (CD4) y por la presencia de afecciones relacionadas con el VIH específicas. Según el sistema de estadificación de los CCE, la definición de SIDA incluye todos los individuos infectados por el VIH con recuentos de CD4 de menos de 200 células/ μ l o un porcentaje de CD4 (sobre todos los linfocitos) de menos de 14%, así como aquéllos con ciertas afecciones y síntomas relacionados con el VIH. Así, según el sistema de los CCE, el recuento de CD4 consiste en el análisis de laboratorio clásico para valorar la fase de VIH y el pronóstico y para controlar el progreso a SIDA y el riesgo de infecciones oportunistas. El recuento de células CD4 también guía al médico en la formulación de diferentes diagnósticos en pacientes sintomáticos y en la decisión acerca de la iniciación de tratamiento antirretroviral (TAR) y comienzo de la profilaxis para infecciones oportunistas.

35 En la infección por VIH no tratada, la replicación del VIH normalmente produce miles de millones de nuevas copias de VIH a diario. El análisis de ARN de VIH en plasma (carga vírica) cuantifica la carga vírica de VIH en el plasma. En áreas con acceso a control de la carga vírica, la carga vírica es una herramienta clásica usada para controlar la respuesta al tratamiento en pacientes que siguen TAR y, conjuntamente con el recuento de células CD4, para valorar el progreso de VIH (véase, en particular, Mellors et al., 1.996, Science, Vol. 272 (5.265): 1.167-170).

El SIDA es una enfermedad pandémica que afecta a más de 30 millones de personas en todo el mundo con más de 2 millones de nuevos infectados al año. Hasta la fecha, el SIDA sigue siendo una enfermedad mortal que ha matado a más de 2 millones de personas en 2.009.

40 Además de la necesidad de disponibilidad de una pluralidad de distintos tratamientos terapéuticos o mejora de manera continua de los TAR existentes, existe también una necesidad constante de una pluralidad de métodos de estadificación o pronóstico, de manera que se proporcionen a los médicos herramientas precisas o complementarias destinadas en particular a determinar el periodo de tiempo apropiado para empezar TAR y ayudarles a adaptar correctamente los tratamientos al perfil del progreso de la enfermedad, sobre una base individualizada.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH-1 en un paciente infectado con un virus VIH-1, que no presenta el fenotipo raro de supervivencia a largo plazo asintomática, cuyo pronóstico se basa en el nivel de anticuerpos dirigidos contra el péptido 3S de la SEC ID N° 2 como un marcador de pronóstico, marcador de pronóstico que es independiente del marcador de pronóstico de recuento de CD4, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 50 a) medir el nivel de anticuerpos dirigidos contra un péptido 3S de la SEC ID N° 2 en una muestra recogida de dicho paciente,
- b) comparar el nivel de anticuerpos medido en la etapa a) con un valor de referencia que es indicativo del progreso de la enfermedad por VIH-1.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama que representa las curvas de Kaplan-Meier que muestra el tiempo de supervivencia sobre un periodo de tiempo de 120 meses de pacientes infectados por VIH-1 con un recuento de CD4 por encima de 200 células/ μ l y con un nivel de anticuerpos anti-3S respectivamente por encima de (curva superior n° 1) o por debajo de (curva inferior n° 2) el valor de referencia predeterminado (aquí, el valor de referencia predeterminado, o valor "límite", es de 50). Abscisa: periodo de tiempo después de la fecha de infección por VIH-1, cuando se expresa en meses. Ordenada: distribución de supervivencia (100% =1 Unidad).

La Figura 2 es un diagrama que representa las curvas de Kaplan-Meier que muestra el tiempo de supervivencia sobre un periodo de tiempo de 36 meses de pacientes infectados por VIH-1 con un recuento de CD4 por encima de 200 células/ mm^3 y con un nivel de anticuerpos anti-3S respectivamente por encima de (curva superior n° 1) o por debajo de (curva inferior n° 2) el valor de referencia predeterminado (aquí, el valor de referencia predeterminado, o valor "límite", es de 50). Abscisa: periodo de tiempo después de la fecha de infección por VIH-1, cuando se expresa en meses. Ordenada: distribución de supervivencia (100% =1 Unidad).

La Figura 3 es un diagrama que muestra las curvas de Kaplan-Meier que muestra el tiempo de supervivencia sobre un periodo de tiempo de 36 meses de pacientes infectados por VIH-1 con un recuento de CD4 por encima de 200 células/ mm^3 y con un nivel de carga vírica respectivamente por debajo de (curva superior n° 1) o por encima de (curva inferior n° 2) el valor de referencia predeterminado (aquí, el valor de referencia de carga vírica, o valor "límite", es de 4 log). Abscisa: periodo de tiempo después de la fecha de infección por VIH-1, cuando se expresa en meses. Ordenada: distribución de supervivencia (100% =1 Unidad).

La Figura 4 ilustra un diagrama de las curvas de Kaplan-Meier que muestra el tiempo de supervivencia sobre un periodo de tiempo de 36 meses de pacientes con un recuento de CD4 por encima de 200 células/ mm^3 y se clasifica en cuatro clases, respectivamente (i) anticuerpos anti-3S por encima del valor de referencia predeterminado (>50) y carga vírica por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 4 log) (curva n° 1), (ii) anticuerpos anti-3S por encima del valor de referencia predeterminado (>50) y carga vírica por encima del valor de referencia predeterminado (>4 log) (curva n° 2), (iii) anticuerpos anti-3S por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 50) y carga vírica por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 4 log) (curva n° 3) y (iv) anticuerpos anti-3S por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 50) y carga vírica por encima del valor de referencia predeterminado (>4 log) (curva n° 4). Abscisa: periodo de tiempo después de la fecha de infección por VIH-1, cuando se expresa en meses. Ordenada: relación de personas vivas (100%=1 Unidad).

La Figura 5 ilustra un diagrama de las curvas de Kaplan-Meier que muestra el tiempo de supervivencia sobre un periodo de tiempo de 120 meses de pacientes con un recuento de CD4 por encima de 200 células/ mm^3 y se clasifica en cuatro clases, respectivamente (i) anticuerpos anti-3S por encima del valor de referencia predeterminado (>50) y carga vírica por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 4 log) (curva n° 1), (ii) anticuerpos anti-3S por encima del valor de referencia predeterminado (>50) y carga vírica por encima del valor de referencia predeterminado (>4 log) (curva n° 2), (iii) anticuerpos anti-3S por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 50) y carga vírica por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 4 log) (curva n° 3) y (iv) anticuerpos anti-3S por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 50) y carga vírica por encima del valor de referencia predeterminado (>4 log) (curva n° 4). Abscisa: periodo de tiempo después de la fecha de infección por VIH-1, cuando se expresa en meses. Ordenada: relación de personas vivas (100%=1 Unidad).

La Figura 6 ilustra un diagrama de las curvas de Kaplan-Meier que muestra el tiempo de supervivencia sobre un periodo de tiempo de 120 meses de pacientes que no tienen SIDA con un recuento de CD4 por encima de 200 células/ mm^3 y se clasifica en cuatro clases, respectivamente (i) anticuerpos anti-3S por encima del valor de referencia predeterminado (>50) y carga vírica por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 4 log) (curva n° 1), (ii) anticuerpos anti-3S por encima del valor de referencia predeterminado (>50) y carga vírica por encima del valor de referencia predeterminado (>4 log) (curva n° 2), (iii) anticuerpos anti-3S por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 50) y carga vírica por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 4 log) (curva n° 3) y (iv) anticuerpos anti-3S por debajo de o igual al valor de referencia predeterminado (≤ 50) y carga vírica por encima del valor predeterminado (>4 log) (curva n° 4). Abscisa: periodo de tiempo después de la fecha de infección por VIH-1, cuando se expresa en meses. Ordenada: relación de personas vivas (100%=1 Unidad).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un nuevo marcador independiente que es indicativo del estado del progreso de una enfermedad por VIH-1 en pacientes infectados por VIH-1. La presente invención proporciona nuevos métodos para determinar el pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH-1, usando dicho nuevo marcador

independiente.

Se ha encontrado según la presente invención que el nivel de anticuerpos dirigidos contra un péptido procedente de VIH-1 específico (el "péptido 3S"), cuando se determina en una muestra de un individuo infectado por VIH-1 analizado, es indicativo del estado de progreso de la enfermedad por VIH-1 de dicho individuo.

5 Dicho péptido 3S, que consiste en un péptido que procede de la glucoproteína gp41 de un virus VIH-1, es conocido por sí mismo. Se ha demostrado en la técnica que el péptido 3S se une a gC1qR en células T CD4+ e induce la expresión de membrana de la proteína NKp44L en células T CD4 (Fauster Bovendo et al., 2.010, PLOS Pathogens, Vol. 6 (7) y la Patente Internacional WO 2010/040853). Se cree que la expresión de NKp44L en la superficie de las células T CD4 desempeña una función clave en la lisis de las células T CD4 por células NK activadas durante la infección por VIH-1-1 y como consecuencia que los anticuerpos específicos dirigidos contra el péptido 3S podían afectar al desarrollo de la enfermedad (véase, Vieillard et al., 2.005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 102: 10.981-10.986).

10 Debré et al. (2.009, Bull Acad Nat Med, Vol. 193 (1): 127-136) describen que el título de los anticuerpos anti-3S está altamente correlacionado con los recuentos de células T CD4+ e inversamente correlacionado con la expresión de NKp44L en la superficie de células T CD4+.

15 También se demostró en la técnica que los anticuerpos anti-3S eran detectados en algunos pacientes infectados por VIH-1 pertenecientes a la cohorte de pacientes muy específica denominada ALT, cohorte que comprende exclusivamente pacientes infectados por VIH-1 con el fenotipo raro de supervivencia a largo plazo asintomática (véase, Vieillard et al., 2.006, AIDS, Vol. 20 (14): 1.795-1.804). Vieillard et al. (2.006) han demostrado la existencia, en dicha cohorte ALT de pacientes, de una correlación entre (i) una disminución en el número de células T CD4+ y (ii) una disminución en el nivel de anticuerpos anti-3S. Vieillard et al. (2.006) también han demostrado que la presencia de anticuerpos anti-3S estaba correlacionada con un alto nivel de células T CD4+, en estos individuos infectados por VIH altamente específico. El desarrollo de un análisis de pronóstico que permitiera predecir la velocidad de progreso a SIDA en pacientes asintomáticos infectados por VIH también se ha considerado en la técnica.

20 Vieillard et al. (2006) concluyeron que la presencia de anticuerpos anti-3S podía afectar al desarrollo de la enfermedad en la inhibición de expresión de NKp44L y sensibilidad de CD4 a lisis de NK. También, Vieillard et al. (2.006) afirmaron que la presencia de anticuerpos anti-3S en el suero ayudaba a controlar el recuento de células CD4. Estos autores observaron que el agotamiento de la población de células T CD4 total estaba estrechamente relacionado con la desaparición de anticuerpos anti-3S. Estos autores también añadieron que la producción de anticuerpos anti-3S podía contribuir posiblemente a ralentizar el agotamiento progresivo de células T CD4.

Ahora se ha encontrado según la presente invención que el nivel de anticuerpos anti-3S consiste en un marcador fiable del estado de progreso de la enfermedad por VIH-1 en un paciente infectado por VIH-1.

35 Sorprendentemente, los autores han demostrado que el nivel de anticuerpos anti-3S es indicativo de manera fiable del progreso de la enfermedad por VIH-1.

Además, se ha demostrado en la presente memoria que el nivel de anticuerpos anti-3S consiste en un marcador indicativo del progreso de la enfermedad por VIH-1, incluso cuando se usa sólo dicho marcador.

40 Aún más, se ha demostrado en la presente memoria que el nivel de anticuerpos anti-3S consiste en un marcador de progreso de la enfermedad por VIH-1 que es independiente de otros marcadores de pronóstico de VIH-1 usados convencionalmente, incluyendo el marcador de pronóstico de recuento de CD4 y el marcador de pronóstico de carga vírica.

45 Se especifica en la presente memoria que los resultados según la presente invención se han obtenido a partir de una cohorte general de pacientes infectados por VIH1, es decir una cohorte de individuos seropositivo en VIH-1 y no de una cohorte de pacientes con el fenotipo raro de supervivencia a largo plazo asintomática como la cohorte ALT estudiada por Vieillard et al. (2.006).

Por definición, los mecanismos de progreso de una infección por VIH en individuos de supervivencia a largo plazo asintomática son distintos de los que se pueden encontrar en la población general de individuos infectados por VIH. Esto se ilustra completamente de nuevo por los hallazgos de la invención descritos en la presente memoria.

50 Se ha encontrado según la invención que, en una población general de pacientes infectados por VIH-1, no hay correlación entre (i) el nivel de anticuerpos anti-3S y (ii) el nivel de células T CD4+, en contraste con los hallazgos de Vieillard et al. que se habían obtenido de la cohorte ALT de pacientes. Los hallazgos de la invención ilustran de nuevo que el experto en la materia no podía esperar beneficiarse de los datos obtenidos de los individuos infectados por VIH de supervivencia a largo plazo asintomática para comprender el progreso de la infección por VIH en la población general de individuos infectados por VIH.

55 Además, como se indicó anteriormente, se cree en la técnica, que la cohorte ALT específica de pacientes, que el

5 nivel de anticuerpos anti-3S estaba fuertemente correlacionado con el recuento de células T CD4. Se vuelve a recordar que los resultados previos de Vieillard et al. (2.006) habrían explicado a lo sumo para un experto en la materia que, debido a la fuerte correlación que se encontró entre el nivel de anticuerpos anti-3S y el recuento de células CD4, se había encontrado una fuerte dependencia entre (i) un marcador de pronóstico de enfermedad por VIH-1, es decir el recuento de células CD4 y (ii) un parámetro biológico de pacientes infectados por VIH-1, es decir el nivel de anticuerpos anti-3S. Incluso en la admisión hipotética de que un experto en la materia hubiera considerado los resultados de Vieillard et al. (2.006), la redundancia descrita previamente de información que se hubiera producido de forma esperada por el recuento de células CD4 y el nivel de anticuerpos anti-3S habría disuadido al experto en la materia de explorar la posibilidad de que el nivel de anticuerpos anti-3S pudiera consistir en un marcador de pronóstico del progreso de la enfermedad por VIH-1.

En aspectos particulares, la invención proporciona un método para pronóstico de la gravedad del progreso de la enfermedad por VIH-1, método que se podía usar en particular para controlar el desarrollo de SIDA, así como para controlar la eficacia terapéutica de los tratamientos antirretrovirales.

15 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH-1 en un paciente infectado con un virus VIH-1 que no presenta el fenotipo raro de supervivencia a largo plazo asintomática, cuyo pronóstico se basa en el nivel de anticuerpos dirigidos contra péptido 3S de la SEC ID N° 2 como un marcador de pronóstico, cuyo marcador de pronóstico, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) medir el nivel de anticuerpos dirigidos contra el péptido 3S de la SEC ID N° 2 en una muestra recogida de dicho paciente,
- 20 b) comparar el nivel de anticuerpos anti-3S medido en la etapa a) con un valor de referencia de nivel de anticuerpos anti-3S que es indicativo del progreso de la enfermedad por VIH-1.

Como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, se ha encontrado una correlación entre el nivel de anticuerpos anti-3S y no la presencia de los mismos y un pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH-1, en la población general de individuos infectados por VIH-1.

25 Como se pretende en la presente memoria, una "enfermedad por VIH-1" incluye básicamente todas las afecciones fisiológicas que experimenta un individuo que ha sido infectado por un virus VIH-1, partiendo del momento del episodio de infección por el virus hasta la fecha de la muerte del individuo, sin tener en cuenta si la muerte del individuo es una consecuencia directa o indirecta del episodio de infección por el virus. Se recuerda que la infección de un individuo con un virus VIH-1 produce una condición patológica crónica que causa progresivamente una reducción de la eficacia del sistema inmunitario y deja a los individuos infectados por VIH-1 susceptibles de infecciones oportunistas y tumores. Así, una enfermedad por VIH-1 incluye el periodo de tiempo de infección primaria (o infección aguda), el periodo de tiempo de seroconversión, el periodo de tiempo de fase asintomática, la fase temprana y media de enfermedad sintomática por VIH-1, así como la fase tardía de enfermedad por VIH-1 (también denominada SIDA).

35 Según la invención, los anticuerpos anti-3S que son dirigidos contra el péptido de la SEC ID N° 2 incluyen anticuerpos que se unen de manera específica a un polipéptido de referencia con una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia peptídica NH₂-SWSNKS-COOH (SEC ID N° 1). Estos anticuerpos se denominan de manera colectiva "anticuerpos anti-3S" en la presente descripción. También pueden corresponder a anticuerpos que se unen a un péptido con una secuencia de aminoácidos que esté estrechamente relacionada con una secuencia de la SEC ID N° 2. Los péptidos con una secuencia estrechamente relacionada con SEC ID N° 2 incluyen los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4, que incluye péptidos con 16 restos aminoácido en longitud y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4, por ej., que incluye (i) una variante del péptido de la SEC ID N° 2 en la que el resto aminoácido serina en la posición 11 es reemplazado por un resto treonina y (ii) una variante del péptido de la SEC ID N° 2 en la que el resto de aminoácido Lisina en la posición 10 es reemplazado por un resto arginina.

Como se desea en la presente memoria, los anticuerpos dirigidos contra un péptido 3S incluyen anticuerpos que se unen al péptido de la SEC ID N° 2.

50 Según la presente invención, los anticuerpos anti-3S preferiblemente consisten en anticuerpos policlonales que se unen a un péptido 3S y que están contenidos en una muestra recogida de un individuo infectado por VIH.

El péptido 3S consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

Como se desea en la presente memoria, el "nivel" de un marcador de pronóstico de enfermedad por VIH consiste en un valor cuantitativo de dicho marcador de pronóstico en una muestra, por ej., en una muestra recogida de un paciente infectado por VIH. En algunas realizaciones, dicho valor cuantitativo no consiste en un valor absoluto que se mide en realidad, pero en su lugar consiste en un valor final que resulta de tener en cuenta una relación señal a ruido que exista con el formato de la ensayo usado y/o tener en cuenta valores de referencia de calibración que se usan para aumentar la reproducibilidad de las mediciones del nivel de un marcador de la enfermedad por VIH, de

- prueba a prueba. En algunas realizaciones, el "nivel" de un marcador de pronóstico de enfermedad por VIH se expresa como unidades arbitrarias, puesto que lo importante es que se compare la misma clase de unidades arbitrarias (i) de prueba a prueba o (ii) de un paciente infectado por VIH a otros o (iii) de pruebas realizadas en periodos de tiempo diferentes para el mismo paciente o (iv) entre el nivel de marcador de pronóstico de VIH medido en una muestra de paciente y un valor de referencia predeterminado (que también se puede denominar un valor "límite" en la presente memoria).
- Por supuesto, cualquiera que sea la clase de unidades numéricas que se usen para expresar el nivel de anticuerpos anti-3S en una muestra, el valor medido refleja la cantidad de anticuerpos anti-3S que está contenida en la muestra de ensayo o lo más preferiblemente la concentración de anticuerpos anti-3S en dicha muestra.
- También, de manera ilustrativa, el marcador de pronóstico de carga vírica de VIH se puede expresar en unidades numéricas que reflejen el número de copias de genoma de VIH contenido en la muestra del paciente analizada o alternativamente la concentración de copias de genoma de VIH en la muestra del paciente analizada.
- De manera similar, se pueden expresar otros marcadores de pronóstico de VIH en unidades numéricas que reflejen, respectivamente, (i) el número de células T CD4 en la muestra analizada o alternativamente la concentración de la misma y (ii) el porcentaje de células T CD4 entre las células linfocíticas totales presentes en la muestra analizada.
- Como se desea en la presente memoria, una muestra recogida de un paciente incluye cualquier fluido corporal que se espere que contenga anticuerpos y principalmente en sangre y sustancias procedentes de la sangre. Según la invención, una muestra recogida de un paciente incluye una muestra de sangre completa, una muestra de suero y una muestra de plasma sanguíneo.
- Como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, el método *in vitro* de la invención permite determinar la probabilidad de una aparición temprana o una retardada de un estado de inmunodepresión en pacientes infectados por VIH. Como consecuencia, el método *in vitro* de pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH de la invención se puede poner en práctica con vistas a determinar el periodo de intervalos de tiempo para seguir los parámetros clínicos de un paciente infectado por VIH y decidir después la oportunidad de comenzar un tratamiento terapéutico antirretroviral.
- Como se muestra también en los ejemplos en la presente memoria, el método *in vitro* de la invención permite determinar el pronóstico de progreso de la enfermedad por VIH en pacientes infectados por VIH que ya hayan experimentado un estado de inmunodepresión debido a la infección vírica. En otras palabras, el método *in vitro* de la invención permite discriminar entre (i) pacientes inmunodeprimidos infectados por VIH con una alta probabilidad de entrar temprano en una fase sintomática de la enfermedad por VIH y (ii) pacientes inmunodeprimidos infectados por VIH con una baja probabilidad de entrar temprano en una fase sintomática de la enfermedad por VIH.
- También, los ejemplos en la presente memoria muestran que el método *in vitro* para pronóstico de progreso de la enfermedad por VIH de la invención permite determinar entre (i) pacientes infectados por VIH con una alta probabilidad de una supervivencia a largo plazo y (ii) pacientes infectados por VIH con una baja probabilidad de una supervivencia a largo plazo.
- En la etapa a) del método, el nivel de anticuerpos anti-3S puede medirse por cualquier método de detección de anticuerpos que sea conocido para un experto en la materia. Así, el nivel de anticuerpos anti-3S puede medirse por cualquier clase de inmunoensayo incluyendo, pero no limitándose a, ELISA, radioinmunoensayos, inmunoensayos de fluorescencia, cromatografía de inmunoafinidad, inmunoprecipitación y similares.
- En algunas realizaciones, el nivel de anticuerpos anti-3S se mide por una prueba de inmunoabsorción, que incluye un método ELISA.
- En la etapa a), el nivel de los anticuerpos anti-3S se expresa como un valor que se refiere a una señal real que se genera, directa o indirectamente, por los complejos formados entre (i) péptidos 3S usados como cebos en el método de detección de anticuerpos y (ii) los anticuerpos anti-3S presentes en la muestra del paciente analizada.
- Como es convencional cuando se realizan métodos de detección de anticuerpos, por ejemplo inmunoensayos como ELISA, el nivel de la señal (es decir, el nivel de anticuerpos anti-3S) se expresa como Unidades Arbitrarias (UA). Las unidades arbitrarias se determinan en general después de sustracción de la señal de ruido de fondo, siendo la última medida de una muestra del mismo tipo que la de la muestra del paciente (por ejemplo, una muestra de suero sanguíneo o una muestra de plasma sanguíneo) que se sabe que está exenta de anticuerpos anti-3S. En general, las Unidades Arbitrarias se determinan después de calibración del método de detección de anticuerpos, usando una serie de patrones de calibración (por ejemplo, una serie de muestras en la que cada muestra contiene una cantidad conocida de anticuerpos anti-3S).
- En la etapa b) del método de pronóstico de la enfermedad por VIH *in vitro* de la invención, el valor de cuantificación del nivel de anticuerpos anti-3S que se mide en la etapa a) se compara con un valor de referencia predeterminado que es indicativo de un pronóstico de enfermedad por VIH. Dicho valor de referencia predeterminado es "indicativo de un pronóstico de la enfermedad por VIH" puesto que permite la discriminación entre (i) un pronóstico "bueno" de

progreso de la enfermedad por VIH para valores medidos en la etapa a) que estén por encima de dicho valor de referencia y (ii) un pronóstico "malo" de progreso de la enfermedad por VIH para valores medidos en la etapa a) que estén por debajo de dicho valor de referencia.

5 Como se describe en los ejemplos en la presente memoria, realizando las curvas de Kaplan-Meier de valores del nivel de anticuerpos anti-3S obtenidos en muestras recogidas de una cohorte grande de individuos infectados por VIH en los que se han seguido hasta varios parámetros clínicos relevantes incluyendo tiempo de supervivencia, los autores han determinado un valor del nivel de anticuerpos anti-3S que permite discriminar entre (i) pacientes con un resultado favorable, incluyendo un progreso de la enfermedad por VIH espontáneo retardado y un tiempo de supervivencia largo y (ii) pacientes con un resultado deficiente, incluyendo un progreso de la enfermedad por VIH espontáneo no retardado y un tiempo de supervivencia corto.

10 De manera ilustrativa, cuando se usa el formato de ensayo ELISA descrito en los ejemplos en la presente memoria, el valor de referencia predeterminado, que también se puede denominar el valor "límite", es de 50. Así, usando el formato de análisis de ELISA descrito en los ejemplos, una muestra recogida de un paciente infectado por VIH donde se ha medido un valor de nivel de anticuerpos anti-3S de menos de 50 en la etapa a) del método *in vitro* según la invención, se clasifica como un paciente con un resultado no favorable. A la inversa, una muestra recogida de un paciente infectado por VIH donde se ha medido un valor de nivel de anticuerpos anti-3S mayor que 50 en la etapa a) del método *in vitro* según la invención, se clasifica como un paciente con un resultado favorable.

15 Para realizar el método de pronóstico de la enfermedad por VIH *in vitro* de la invención, el valor de referencia usado para comparación en la etapa b) del método, que también se puede denominar como un valor "límite"), se puede determinar como se describe a continuación.

El valor de referencia ("límite") para el marcador de pronóstico de los anticuerpos anti-3S puede determinarse llevando a cabo un método que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una colección de muestras de pacientes infectados por VIH;
- 25 b) proporcionar para cada muestra de paciente proporcionada en la etapa a), información referente al resultado clínico real para el paciente infectado por VIH correspondiente;
- c) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios para el nivel de anticuerpos anti-3S;
- d) cuantificar el nivel de anticuerpos anti-3S en cada muestra de paciente contenida en la colección proporcionada en la etapa a);
- 30 e) clasificar dichas muestras de los pacientes en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico proporcionado en la etapa b), respectivamente:
 - (i) un primer grupo que comprende muestras de pacientes que presentan un valor de cuantificación para el nivel de anticuerpos anti-3S que es menor que dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación;
 - 35 (ii) un segundo grupo que comprende muestras de pacientes que presentan un valor de cuantificación para el nivel de anticuerpos anti-3S que es mayor que dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación;
- con lo cual se obtienen dos grupos de muestras de pacientes para dicho valor de cuantificación específico, en los que las muestras de los pacientes de cada grupo se enumeran por separado;
- 40 f) calcular la significancia estadística entre (i) el valor de cuantificación para dicho marcador biológico obtenido en la etapa d) y (ii) el resultado clínico real de los pacientes de los que proceden las muestras de suero/plasma contenidas en los grupos primero y segundo definidos en la etapa e);
- g) analizar por las etapas e) y f) varios valores arbitrarios,
- 45 h) fijar dicho valor de referencia (valor "límite") como consistente en el valor de cuantificación arbitrario obtenido para el que se haya observado la significancia estadística más alta (la más significativa) en la etapa g).

Como se describió anteriormente, dicho método permite fijar un valor "límite" que permita la discriminación entre pronóstico de resultado malo y bueno.

50 Como se desea en la presente memoria descriptiva y como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, (i) un pronóstico de resultado malo incluye una alta probabilidad de que el comienzo de los síntomas clínicos de SIDA tenga lugar en un periodo de tiempo de 6-72 meses después del instante de infección por VIH, así como un periodo de tiempo corto de supervivencia para pacientes con un recuento de células T CD4 por debajo de 500 células/mm³ (que incluye pacientes con un recuento de células T CD4 por debajo de 200 células/mm³, mientras que (ii) un

pronóstico de resultado bueno incluye una baja probabilidad de que el comienzo de los síntomas clínicos de SIDA tenga lugar en un periodo de tiempo de 6-72 meses después del instante de la infección con VIH, así como un largo periodo de tiempo de supervivencia para pacientes con un recuento de células T CD4 por debajo de 500 células/mm³ (que incluye pacientes con un recuento de células T CD4 por debajo de 200 células/mm³).

- 5 En algunas realizaciones preferidas de la etapa b) del método para determinar valores límite anteriores, dicha información referente al resultado clínico real de los pacientes infectados por VIH se selecciona del grupo que consiste en (i) la duración de la supervivencia sin SIDA (SSS) y (ii) tiempo de supervivencia de pacientes con un recuento de células T CD4 por debajo de 500 células CD4 /mm³ o por debajo de 200 células CD4 /mm³ (TCDB).

10 Como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, la precisión del pronóstico de enfermedad por VIH, cuando se usa el nivel de anticuerpos anti-3S como un marcador de pronóstico, puede mejorarse además por combinación de dicho marcador de pronóstico con uno o más marcadores de pronóstico de VIH conocidos por sí mismos, por ejemplo, la carga vírica de VIH.

15 Como se muestra en los ejemplos, la precisión del pronóstico de enfermedad por VIH del nivel de anticuerpos anti-3S es significativamente mayor que la precisión del pronóstico de uno de los otros marcadores de pronóstico de VIH conocidos, es decir la carga vírica. Sin embargo, los ejemplos también muestran que la precisión del pronóstico del método de pronóstico de la enfermedad por VIH *in vitro* de la invención puede mejorarse por combinación de (i) el marcador de carga vírica y (ii) el nivel de marcador de anticuerpos anti-3S.

Así, en algunas realizaciones del método *in vitro* para pronóstico de la enfermedad por VIH de la invención, dicho método comprende además las etapas de:

- 20 1) medir la carga vírica de VIH en dicha muestra recogida de dicho paciente y
2) comparar el valor de la carga vírica medido en la etapa 1) con un valor de referencia que sea indicativo del progreso de la enfermedad por VIH.

25 En la realización del método anterior, la carga vírica puede medirse por una cualquiera de las técnicas convencionales que son conocidas para un experto en la materia. De manera ilustrativa, la carga vírica puede medirse usando el método descrito por Jennings et al. (2.005, J Clin Microbiol, Vol. 43 (12): 4.950-4.956). Por supuesto, el valor de referencia para la cuantificación de carga vírica puede determinarse usando los mismos métodos que los descritos en la presente memoria para calcular el valor de referencia predeterminado (o valor "límite") del nivel de anticuerpos anti-3S.

30 Como un experto en la materia puede comprender fácilmente, el valor de referencia predeterminado (o valor "límite") para el marcador de carga vírica puede variar, dependiendo del formato de ensayo de carga vírica que se use.

De manera ilustrativa, un valor de referencia predeterminado (valor "límite") de 4 log para el marcador de carga vírica se ha usado en los ejemplos para realizar el método de pronóstico de la enfermedad por VIH *in vitro* de la invención.

35 Sin desear estar ligados por ninguna teoría particular, los autores creen que el método *in vitro* de pronóstico de la enfermedad por VIH de la invención puede realizarse combinando el marcador de pronóstico de anticuerpos anti-3S con otro u otros marcadores de pronóstico de la enfermedad por VIH más. Ese o esos marcadores de pronóstico de la enfermedad por VIH pueden seleccionarse del grupo que consiste en (i) la carga vírica de VIH, (ii) el recuento de células T CD4 absoluto y (iii) el porcentaje de linfocitos T CD4+.

Según estas realizaciones, el método *in vitro* para el pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH puede comprender las etapas de:

- 40 a) medir el nivel de anticuerpos anti-3S y al menos otro marcador de pronóstico de la enfermedad por VIH en una muestra recogida de un paciente infectado por VIH y
b) comparar, para cada marcador de pronóstico de la enfermedad por VIH medido en la etapa a), el valor del marcador resultante con un valor de referencia para dicho marcador de pronóstico.

45 En realizaciones preferidas, dicho otro u otros marcadores más de pronóstico de la enfermedad por VIH se seleccionan del grupo que consiste en (i) la carga vírica por VIH, (ii) el recuento absoluto de células T CD4, (iii) el porcentaje de células T CD4 y (iv) la relación de linfocitos T CD4+/CD8+. Estos incluyen las siguientes combinaciones de marcadores de pronóstico de la enfermedad por VIH:

- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (i) anterior,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (ii) anterior,
- 50 - nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (iii) anterior,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (iv) anterior

- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i) y (ii) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i) y (iii) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i) y (iv) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (ii) y (iii) anteriores,
- 5 - nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (ii) y (iv) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (iii) y (iv) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (ii) y (iii) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (ii) y (iv) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (ii), (iii) y (iv) anteriores,
- 10 - nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (iii) y (iv) anteriores, y
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (ii), (iii) y (iv) anteriores,

Dependiendo de si cada uno de los valores del marcador medidos en la etapa a) está por encima o por debajo de los valores de referencia respectivos a los que se comparan en la etapa b), se determina un pronóstico "bueno" de progreso de la enfermedad por VIH o un pronóstico "malo" de progreso de la enfermedad por VIH. Por supuesto, (i) un valor de anticuerpos anti-3S por encima del valor predeterminado se clasifica como un pronóstico "bueno", mientras que (ii) un valor de carga vírica por encima del valor de referencia predeterminado se clasifica como un parámetro de pronóstico "malo".

Por supuesto, los resultados de la etapa b) incluyen situaciones en las que (i) para al menos un marcador de pronóstico de VIH analizado, el valor de marcador medido en la etapa a) se clasifica como un pronóstico "malo" para dicho marcador (es decir, el marcador puede ser marcado "Bajo") y (ii) para al menos otro marcador de pronóstico de VIH analizado, el valor del marcador medido en la etapa a) se clasifica como un pronóstico "bueno" para dicho marcador (es decir, el marcador puede ser marcado "Alto"). En estas situaciones, el pronóstico para progreso de la enfermedad por VIH se determina teniendo en cuenta el número y opcionalmente los respectivos pesos estadísticos, de marcadores "Altos" y marcadores "Bajos". En algunas realizaciones, el valor medido para cada marcador analizado se equilibra modificando dicho valor del marcador medido por un factor numérico que materialice su peso de significancia estadística en el pronóstico de progreso de la enfermedad por VIH.

En las realizaciones del método para el pronóstico de progreso de la enfermedad por VIH de la invención en la que el marcador de pronóstico de anticuerpos anti-3S se combina con otro u otros marcadores de pronóstico de la enfermedad por VIH, más, la etapa b) se realiza integrando de manera matemática los valores medidos en la etapa a) para cada marcador de pronóstico de VIH analizado y su comparación con cada uno de los valores de referencia correspondientes, de manera que se genera un valor de predicción único (por ej., pronóstico "malo" o pronóstico "bueno") del marcador de pronóstico de la enfermedad por VIH compuesto resultante. La generación de marcadores compuestos que integran una combinación de dos o más marcadores es conocida para el experto en la materia.

De manera ilustrativa, un marcador de pronóstico compuesto para progreso de la enfermedad por VIH puede resultar de una combinación lineal de cada marcador de pronóstico individual incluido en el mismo, en el caso de que se pueda usar regresión logística para estimar el respectivo peso de cada marcador de pronóstico individual en el marcador de pronóstico compuesto. Alternativamente, se podía usar un modelo matemático apropiado para establecer el valor de pronóstico de la combinación de marcadores usada.

La presente invención proporciona además un método para controlar la eficacia de un tratamiento terapéutico para infección por VIH, proporcionando un indicador de pronóstico preciso de progreso de la enfermedad. Dicho método de control es muy importante tanto (i) para identificar posibles fármacos terapéuticos como (ii) para controlar a los pacientes que experimentan tratamientos con estos fármacos.

Especialmente, la presente invención se refiere a un método para controlar la eficacia de un tratamiento terapéutico que comprende las etapas de:

- 45 a) realizar un tratamiento terapéutico por administración, a un paciente infectado por VIH con necesidad del mismo, de una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes antirretrovirales y
- b) realizar el método *in vitro* para pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH descrita en la presente memoria en una muestra recogida de dicho paciente y
- c) adaptar convenientemente el tratamiento terapéutico realizado en la etapa a), si es necesario.

En algunas realizaciones, el tratamiento terapéutico que se realiza en la etapa a) se continúa si se determina un pronóstico “bueno”, por ejemplo, una alta probabilidad de un tiempo de supervivencia largo sin entrar en la fase de SIDA.

5 En algunas realizaciones, se adapta el tratamiento terapéutico (por ej., se administra una dosis mayor o uno o más principios activos se reemplazan por unos más eficaces) si se determina un pronóstico “malo”, por ej., una baja probabilidad de un tiempo de supervivencia largo sin entrar en la fase de SIDA.

En un aspecto específico, la invención considera la administración de una cantidad eficaz de un agente antivírico (o de una combinación de agentes antivíricos) a un individuo infectado por VIH y controlar el resultado terapéutico.

10 Como ya se ha especificado previamente en la presente descripción, el método *in vitro* de pronóstico para progreso de una enfermedad por VIH se realiza preferiblemente por métodos de inmunodetección conocidos. Los ejemplos en la presente memoria ilustran realizaciones para realizar el método de pronóstico de VIH *in vitro* de la invención por un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), que es un método de inmunodetección altamente convencional. Como otros métodos de inmunodetección, se puede realizar un ELISA como un inmunoensayo no competitivo o como un inmunoensayo competitivo.

15 En un ELISA no competitivo, se liga antígeno no etiquetado (por ej., un péptido 3S) a un soporte sólido o recipiente de reacción, tal como la superficie de una placa de microtítulo o biochip.

20 Después, la muestra biológica (por ej., la muestra recogida de un paciente infectado por VIH) se combina con el antígeno ligado al recipiente de reacción y se permite que los anticuerpos presentes en la muestra biológica (por ej., los anticuerpos anti-3S presentes en la muestra recogida de un paciente infectado por VIH) se unan a los antígenos inmovilizados en el soporte sólido, formándose así inmunocomplejos.

25 Después de que se han formado los inmunocomplejos, se retira la muestra biológica en exceso y se lava el recipiente para retirar los anticuerpos ligados de manera no específica. Se hacen reaccionar después los inmunocomplejos con una anti-inmunoglobulina ligada a enzima, apropiada, (que también se puede denominar “anticuerpo secundario”). El anticuerpo secundario reacciona con los anticuerpos (por ej., los anticuerpos anti-3S) en los inmunocomplejos, no con otros antígenos ligados al recipiente de reacción. Los anticuerpos secundarios específicos para unir anticuerpos humanos son conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles, tales como de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

30 Después de una segunda etapa de lavado, se añade el sustrato enzimático. La enzima ligada al anticuerpo secundario cataliza una reacción que convierte el sustrato en un producto detectable. Cuando está presente antígeno en exceso, la cantidad de producto es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos (también denominados “anticuerpos primarios”) presentes en la muestra del paciente.

En algunas realizaciones, el producto es fluorescente o luminescente, que puede medirse usando tecnología y equipo conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la reacción enzimática da como resultado la conversión del sustrato enzimático en un producto coloreado, que se puede medir de manera espectrofotométrica.

35 Las enzimas típicas que pueden unirse a anticuerpos secundarios incluyen peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y ureasa.

Para realizar ELISA, los soportes sólidos adecuados incluyen polímeros orgánicos e inorgánicos, por ej., dextranos, celulosas naturales o modificadas, polietileno, poliestireno, poliacrilamidas, etc.

40 Para realizar el pronóstico *in vitro* para progreso de la enfermedad por VIH según la invención, por inmunodetección de los anticuerpos anti-3S usando un péptido 3S de la SEC ID N° 2, dicho péptido 3S se puede obtener (i) por síntesis química o (ii) por expresión recombinante, por ej., en células *E. coli* transformadas con una casete de expresión (normalmente insertada en un vector recombinante, es decir, un plásmido recombinante) que codifica dicho péptido 3S.

La presente invención se ilustra además, sin limitarse de ningún modo a, los ejemplos a partir de ahora.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación del nivel de anticuerpos anti-3S como un marcador de pronóstico del progreso de una enfermedad por VIH.

A. Materiales y Métodos

A.1. Pacientes

50 La cohorte SEROCO/HEMOCO de ANRS iniciada en 1.988 tiene adultos infectados por VIH registrados en 21 hospitales y una red de médicos privados. El estudio fue homologado por el Comité Ético y todos los individuos proporcionaron consentimiento informado por escrito. Los pacientes experimentan exhaustivos exámenes clínicos y

de laboratorio a la inclusión y son observados después cada 3 ó 6 meses según su estado clínico. Se comprueban todas las enfermedades que definen el SIDA en los archivos médicos y se revisan con los médicos participantes. El estado clínico de los pacientes a los que no se pudo dar seguimiento se valora por verificación cruzada con el registro de SIDA nacional. Se almacenaron los sueros recogidos en el momento del reclutamiento y en cada visita a los 6 meses a menos 180°C.

En este estudio los pacientes aptos tuvieron una fecha conocida de seroconversión, se incluyeron en la cohorte en 24 meses después de la infección y antes de 1.996 y tuvieron muestras de suero criopreservadas disponibles del registro. La seroconversión de VIH se documentó por un intervalo de menos de 24 meses entre un ensayo de anticuerpos de VIH negativo y uno positivo o un método Western incompleto seguido por un método Western completo. La fecha de infección se definió como la fecha del método Western incompleto menos 1 mes o la fecha de una infección sintomática primaria menos 15 días o el punto medio entre las dos pruebas (Hubert 2.000). Se incluyeron 244 seroconvertidores con sueros congelados disponibles en este análisis. El seguimiento se censó en 1.996, antes de la era de uso extendido de cTAR. El año de infección de la mediana fue 1.989 y el tiempo de seguimiento de la mediana desde la infección fue 6,5 años.

15 A.2. Protocolo de estudio.

Se consideran 244 seroconvertidores no tratados por VIH-1 registrados antes de 1.996 en la cohorte SEROCO, en 24 meses después de la infección (año de registro de la mediana 1.989). El seguimiento se censó en 1.996, el seguimiento de la mediana fue 6,5 años. Los niveles de anticuerpos anti-3S tempranos se midieron en el momento del reclutamiento de sueros congelados. Para estimar la función de los anticuerpos anti-3S sobre el riesgo de progreso de la enfermedad, se estimó el tiempo desde la infección a CD4 por debajo de 200/mm³ (91 episodios) SIDA clínico (83 episodios) por las curvas de Kaplan-Meier, comparando pacientes con anticuerpos > 50 unidades/ml con aquellos con niveles menores o no detectables. Se estimaron RR brutos y ajustados por modelos de regresión Cox.

A.3. Medida del nivel de anticuerpos anti-3S.

25 El ensayo ELISA se realizó en microplacas de 96 pozos de fondo plano (Maxisorp, Nunc).

Se descubrieron las placas con el péptido 3S a 2 mg/ml en PBS, durante la noche 17 h a 4°C. se lavaron las placas dos veces en PBS/Tween al 0,1% y después se bloquearon en PBS/leche desnatada al 3% durante 2 h a 37°C.

30 Se inactivaron por calor el suero/los plasmas analizados (56°C, 45 min) y después se añadieron a varias concentraciones (1/20, 1/200 y 1/2.000) por triplicado durante 1 h 30 min a 37°C. Se diluyeron los sueros en tampón de ensayo (PBS, leche desnatada al 3%, tween-20 al 0,1%).

Después de lavar dos veces en PBS/Tween al 0,1%, se añadió IgG anti-humano de conejo conjugado de biotina-SP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/2.000 y se incubó durante 1 h a 37°C. Se diluye el anticuerpo conjugado de biotina en tampón de ensayo (PBS, leche desnatada al 3%, tween-20 al 0,1%)

35 Después de lavado, se capturó la biotina usando un conjugado de peroxidasa ExtraAvidin diluido a 1/5.000 (Sigma) durante 1 h a 37°C. Se diluye ExtrAvidin en tampón de ensayo (PBS, leche desnatada al 3%, tween-20 al 0,1%). Después del último lavado, se desarrolló color con disolución de sustrato y se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm.

Se lavaron las placas dos veces en PBS/Tween al 0,1% y después 2 veces en PBS y se reveló el color en presencia de TMB (Sigma) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min.

40 Se detiene la reacción química con H₂SO₄ 4 N y se analiza a 450 nm (lector de microplacas, Molecular Devices).

Los controles negativos usaron suero humano AB (SAB) y plasma de 10 donantes no infectados, diluido a 1/20 en tampón de ensayo.

45 La cuantificación de anticuerpos anti-3S usó patrones de calibración incluyendo diluciones de un anticuerpo monoclonal anti-3S de ratón purificado, denominado 15C8f2. La curva clásica corresponde a diluciones de 2 veces en serie de este anticuerpo monoclonal, con valor comprendido entre 0 y 200 ng/ml. El anticuerpo monoclonal se diluye en tampón de ensayo.

La DO de las muestras analizadas se indica en la parte lineal de la curva clásica para obtener la correspondiente concentración de anticuerpo monoclonal 15C8F2 proporcionando la misma señal.

50 Los valores de los anticuerpos anti-3S, expresados en unidades arbitrarias, se determinan teniendo en cuenta el factor de dilución de las muestras ensayadas y el volumen. El límite de detección se fija para los valores obtenidos para el control negativo y se fija a un valor de 10 unidades arbitrarias.

A.4. Otros métodos

Se determinan los recuentos de linfocitos CD4 en cada visita por medio de citometría de flujo. Se determinaron todos los niveles de ARN de VIH-1 de manera retrospectiva de sueros almacenados.

5 Los tres laboratorios universitarios participantes usaron reacción en cadena de la transcriptasa inversa - polimerasa (ensayo Amplicor VIH-1 Monitor, Roche Molecular Systems, Neuilly-sur-Seine, umbral de cuantificación 400 copias/ml). Los niveles de anticuerpos anti-3S tempranos se midieron en el momento del reclutamiento de los sueros congelados (tiempo de la mediana desde los datos estimados de infección: 9 meses).

A.5 Análisis estadístico.

Se usó el análisis de chi-cuadrado de Pearson o prueba exacta de Fisher para comparar variables cualitativas; se usó análisis de Kruskal Wallis no paramétrico para variables continuas.

10 Para evaluar la cualificación del nivel de anticuerpos anti-3S como un marcador de pronóstico del riesgo de progreso de la enfermedad por VIH, se estimó el tiempo desde la infección a CD4 por debajo de 200/mm³ (91 episodios) y a SIDA clínico (83 episodios) por las curvas de Kaplan-Meier. Se compararon las curvas de supervivencia sin episodios en pacientes con anticuerpos > 50 unidades/ml con aquéllos con niveles menores o no detectables usando la prueba de rango logarítmico. Se estimaron los riesgos relativos (RR) brutos y ajustados usando un modelo de Cox.

B. Resultados

20 El 72% de los seroconvertidores presentaron anticuerpos anti-3S detectables próximos a seroconversión (tiempo de la mediana desde la fecha estimada de infección: 9 meses), (el 53% estuvo por encima de 50 unidades. Se correlacionaron de manera inversa los niveles de anticuerpos anti-3S en el momento del reclutamiento con los niveles de ARN de VIH, mientras que no se encontró asociación con recuentos de CD4, como se muestra en la Tabla 1 a continuación. Así, los resultados muestran que el nivel de anticuerpos anti-3S y el recuento de células T CD4 consisten en marcadores independientes.

Tabla 1

Nivel anti-3S	<10	11-50	51-85	86-120	121-180	>180	P
	N=69	N=45	N=48	N=39	N=32	N=11	
Inclusión CD4 *	530	534	563	520	609	610	0,61
* Mediana							

25 El progreso a CD4 por debajo de 200/mm³ se retrasó significativamente en pacientes con anti-3S Ab >50, pero el efecto fue transitorio (término de interacción entre Ab anti-3S y el tiempo: p=0,003). Estos resultados se ilustran en las figuras 1 y 2.

30 Los resultados de las figuras 1 y 2 muestran que el riesgo de progreso hacia un recuento de células T CD4 por debajo de 200 células T CD4 /mm³ se retrasa en pacientes con un nivel de anticuerpos anti-3S por encima del valor límite de 50, cuando se tienen en cuenta los primeros 120 meses después de la inclusión (figura 1; P rango logarítmico =0,07; P Wilcoxon=0,02) o los primeros 36 meses después de la inclusión (figura 2; P rango logarítmico =0,002; P Wilcoxon=0,02). Los resultados de las figuras 1 y 2 muestran que el nivel de anticuerpos anti-3S consiste en un marcador real de pronóstico para el progreso de una enfermedad por VIH y en particular para pronóstico de supervivencia en pacientes infectados por VIH con un recuento de células T CD4 por encima de 200/mm³.

35 Durante los primeros 3 años después de la infección el riesgo relativo (RR) para CD4<200/mm³ fue 0,21 ([95% de CI: 0,07-0,62], p=0,005).

Esta ventaja de supervivencia fue observada aún después del ajuste para la carga vírica de referencia y CD4, edad y sexo (RR ajustado: 0,23 [0,07-0,73], p=0,01). Se observaron resultados similares para el tiempo para SIDA.

40 Las curvas de Kaplan-Meier muestran que el beneficio de supervivencia en pacientes con anticuerpos >50 unidades/ml y carga vírica >4log comparado con otros pacientes con carga vírica > 4 log no se mantuvo más a los 5-6 años. Estos resultados se ilustran en las figuras 4 a 6. La Figura 3 ilustra el valor del pronóstico de VIH del marcador de carga vírica de VIH sólo (p rango logarítmico =0,005; P Wilcoxon=0,006). Ambos biomarcadores presentan un valor del pronóstico intrínseco diferente, siendo cada uno de éstos independiente.

La figura 3 ilustra un análisis del nivel de carga vírica de VIH durante los primeros 36 meses después del

reclutamiento, clasificándose los valores de carga vírica como por encima de o por debajo del valor límite de 4 log.

5 La figura 4 ilustra el análisis combinado de (i) el nivel de anticuerpos anti-3S (por encima de ("Al") o por debajo de ("Ba") el valor límite de 50) y (ii) el nivel de la carga vírica del VIH (por encima de o por debajo del valor límite de 4 log), durante 36 meses posteriores a la contaminación. Los resultados de la figura 4 muestran que se determina un pronóstico de progreso más preciso de la enfermedad por VIH cuando el marcador de nivel de anticuerpos anti-3S (pacientes infectados por VIH con un nivel de anticuerpos anti-3S por encima del valor límite de 50) se combina con el marcador de carga vírica de VIH (valor de carga vírica de VIH por debajo del valor límite de 4 log) (p rango logarítmico =0,001; P Wilcoxon=0,001). Se muestran los mismos resultados para 120 meses posteriores a la contaminación en la figura 5 (p rango logarítmico =0,0001; p Wilcoxon=0,0001).

10 La figura 6 ilustra el pronóstico del riesgo de progreso hacia SIDA cuando se usa la medida combinada de (i) el nivel de anticuerpos anti-3S y (ii) el nivel de la carga vírica de VIH), durante 120 meses posteriores a la contaminación. Los resultados de la Figura 6 muestran el pronóstico altamente preciso de progreso de la enfermedad por VIH, con valores altamente significativos de P rango logarítmico =0,0005 y P Wilcoxon=0,0003, respectivamente.

15 Un subconjunto de individuos presentó sus anticuerpos medidos de nuevo a 24-36 meses después del reclutamiento.

Los individuos con anticuerpos persistentemente altos aún presentaron una ventaja de supervivencia sin enfermedad comparado con individuos que experimentaron una pérdida en niveles de anticuerpos anti-3S por debajo de 50.

20 Finalmente, se muestra en la Tabla 2 a continuación que el nivel de anticuerpos anti-3S y la carga vírica por VIH consiste en dos marcadores de pronóstico independientes para el progreso de la enfermedad por VIH en pacientes infectados por VIH.

Tabla 2

Anticuerpos anti-3S	RR bruto (CI 95%)	p	RR ajustado** (CI 95%)	p
Anti-3S Ab ≤ 50	1		1	
Anti-3S Ab >50	0,21 (0,07-0,62)	0,005	0,31 (0,10-0,98)	0,046
** ajustado sobre edad, sexo, carga vírica y ADN de VIH.				

25 Los resultados de la Tabla 2 también muestran que el riesgo de progreso, durante un periodo de 36 meses, hacia un recuento de células T CD4 de menos de 200 células T CD4/mm³ se retrasa en pacientes con un nivel de anticuerpos anti-3S por encima del valor límite de 50, después de ajuste con edad, sexo, ARN y ADN de VIH.

Todos estos resultados muestran que el nivel de CD4, carga vírica y anti-3S son tres marcadores independientes de pronóstico de infección por VIH. Además, se ha determinado un valor umbral de anti-3S como un valor límite entre pacientes de pronóstico deficiente y bueno.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para el pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH-1 en un paciente infectado con un virus VIH-1, que no presenta el fenotipo raro de supervivencia a largo plazo asintomática, cuyo pronóstico se basa en el nivel de anticuerpos dirigidos contra péptido 3S de la SEC ID N° 2 como un marcador de pronóstico, marcador de pronóstico que es independiente del marcador de pronóstico de recuento de CD4, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) medir el nivel de anticuerpos dirigidos contra el péptido 3S de la SEC ID N° 2 en una muestra recogida de dicho paciente,
- b) comparar el nivel de anticuerpos anti-3S medido en la etapa a) con un valor de referencia de nivel de anticuerpos anti-3S que es indicativo del progreso de la enfermedad por VIH-1.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa a) se realiza por inmunodetección de los anticuerpos dirigidos contra el péptido de la SEC ID N° 2.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa a) se realiza por un ensayo ELISA usando un polipéptido que comprende el péptido de la SEC ID N° 2 inmovilizado sobre un soporte sólido.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, definido además como que comprende las siguientes etapas:
- 1) medir la carga vírica de VIH-1 en dicha muestra recogida de dicho paciente y
- 2) comparar el valor de la carga vírica medido en la etapa 1) con un valor de referencia que es indicativo del progreso de la enfermedad por VIH-1.
- 20 5. El método *in vitro* para el pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH-1 según la reivindicación 1, en el que:
- la etapa a) comprende además medir al menos otro marcador de pronóstico de la enfermedad por VIH-1 en una muestra recogida de un paciente infectado por VIH-1 y
- la etapa b) comprende comparar, para cada marcador de pronóstico de enfermedad por VIH-1 medido en la etapa a), valor del marcador que resulta con un valor de referencia para dicho marcador de pronóstico.
- 25 6. El método *in vitro* según la reivindicación 5, en el que ese u otros marcadores de pronóstico de la enfermedad por VIH-1 más, se seleccionan del grupo que consiste en (i) la carga vírica de VIH, (ii) el recuento absoluto de células T CD4, (iii) el porcentaje de células T CD4 y (iv) la relación de linfocitos T CD4+/CD8+.
7. El método *in vitro* según la reivindicación 6, en el que la etapa a) comprende la medición de una combinación de marcadores de pronóstico de la enfermedad por VIH-1 seleccionados del grupo que consiste en:
- 30 - nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (i) anterior,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (ii) anterior,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (iii) anterior,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcador (iv) anterior
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i) y (ii) anteriores,
- 35 - nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i) y (iii) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i) y (iv) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (ii) y (iii) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (ii) y (iv) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (iii) y (iv) anteriores,
- 40 - nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (ii) y (iii) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (ii) y (iv) anteriores,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (ii), (iii) y (iv) anterior,
- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (iii) y (iv) anteriores y

- nivel de anticuerpos anti-3S combinado con marcadores (i), (ii), (iii) y (iv) anteriores,

- 5 8. Un método para controlar la eficacia de un tratamiento terapéutico que comprende la etapa de realizar el método *in vitro* para pronóstico de progreso de una enfermedad por VIH-1 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una muestra recogida de un paciente infectado por VIH-1 que no presenta el fenotipo raro de supervivencia a largo plazo asintomática y que experimenta un tratamiento terapéutico con una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes antirretrovirales.

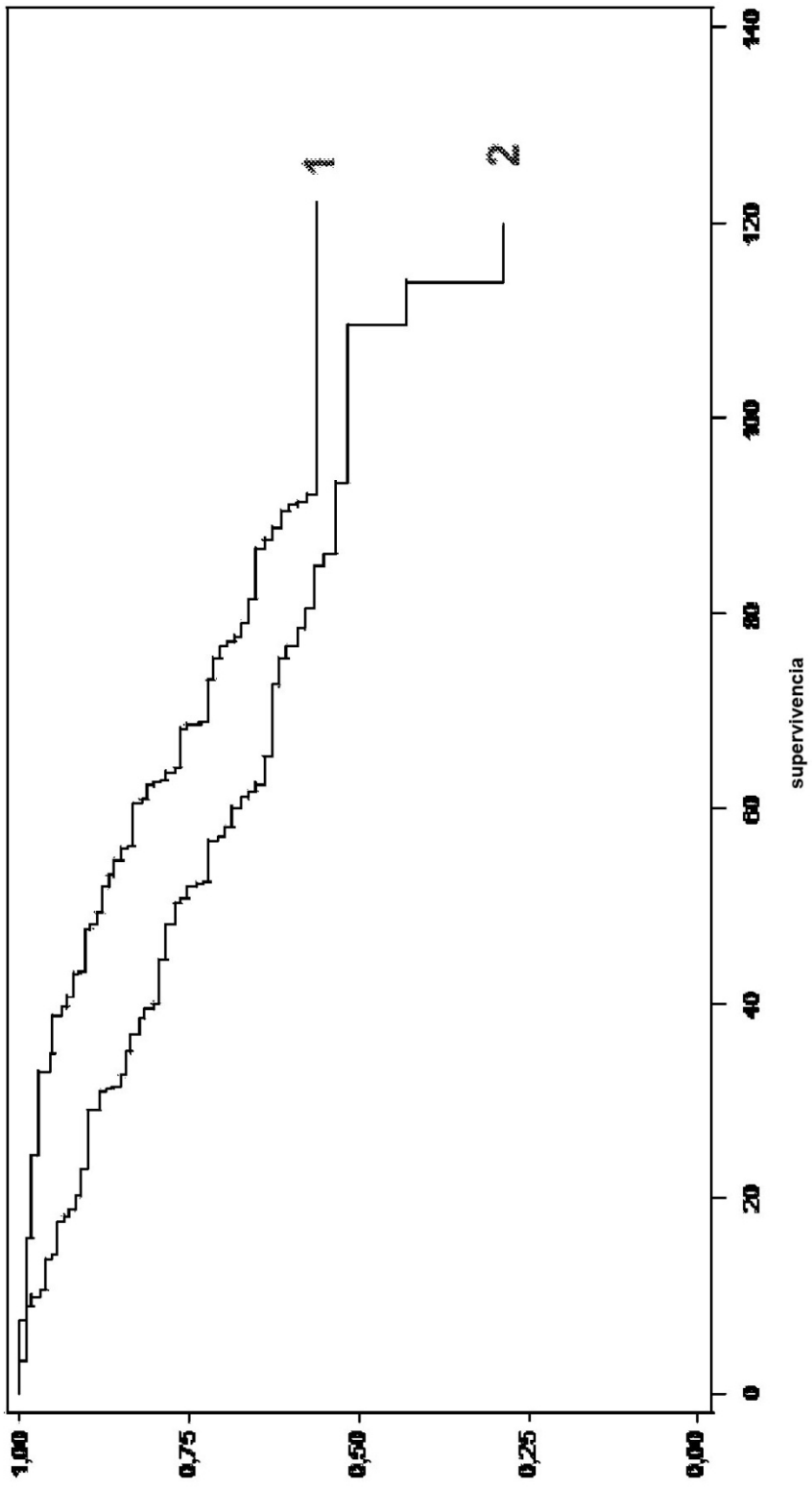


Figura 1

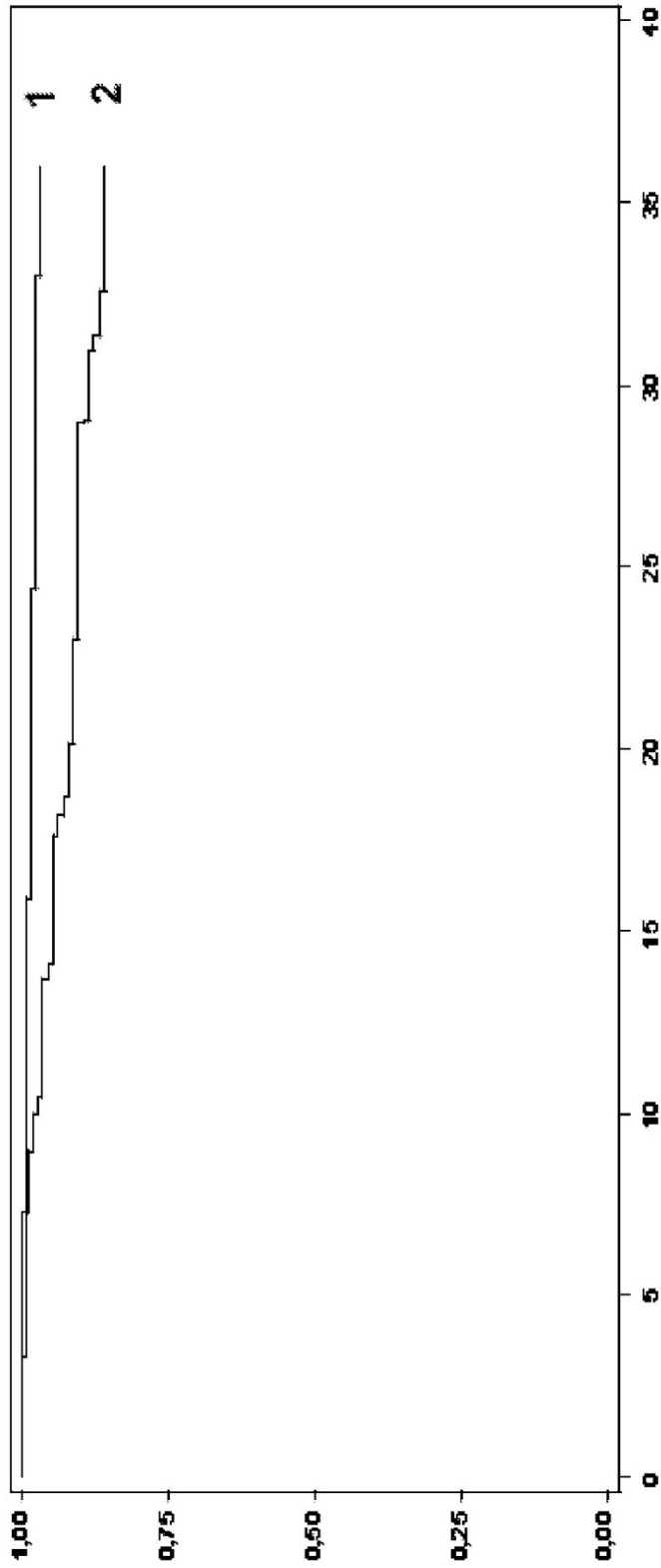


Figura 2

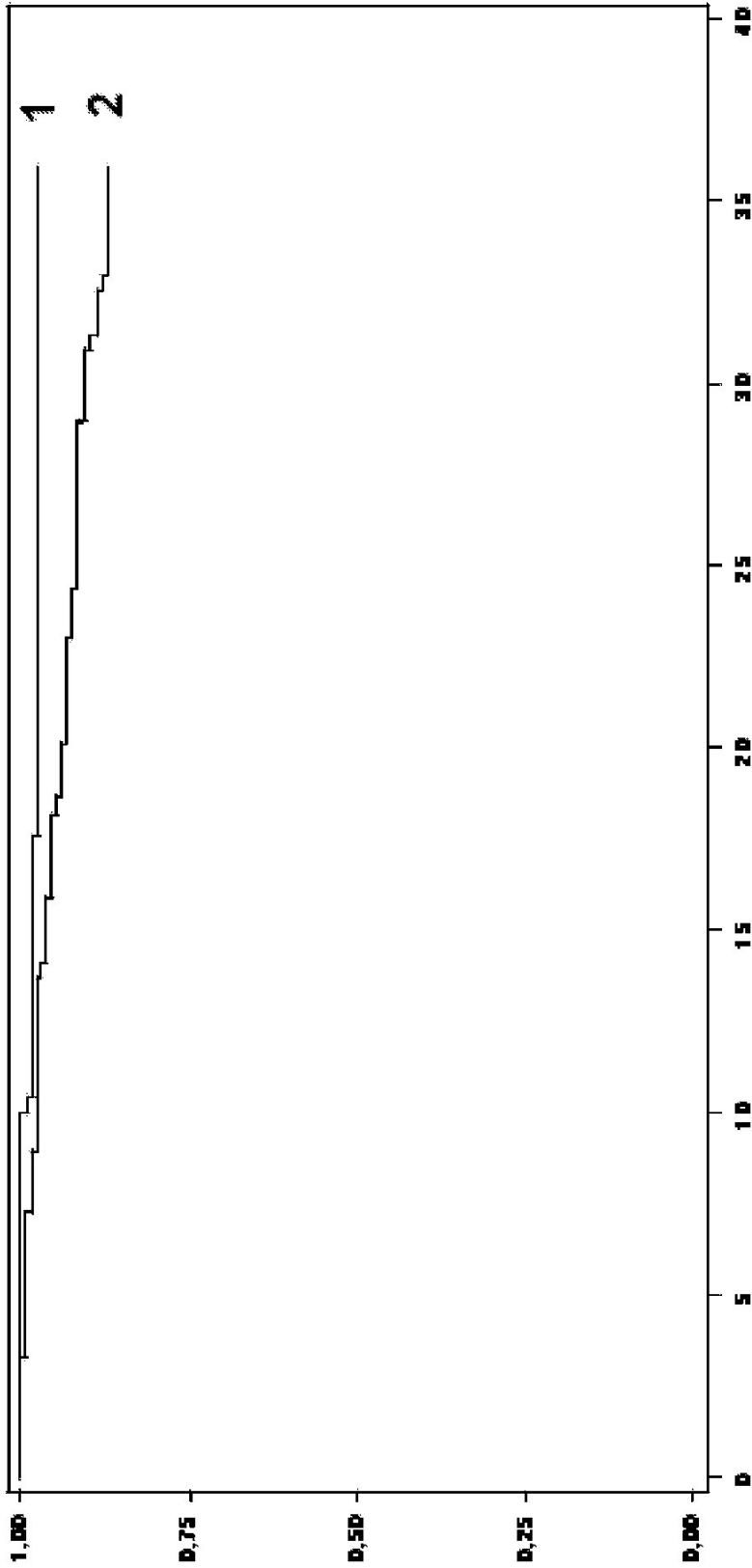


Figura 3

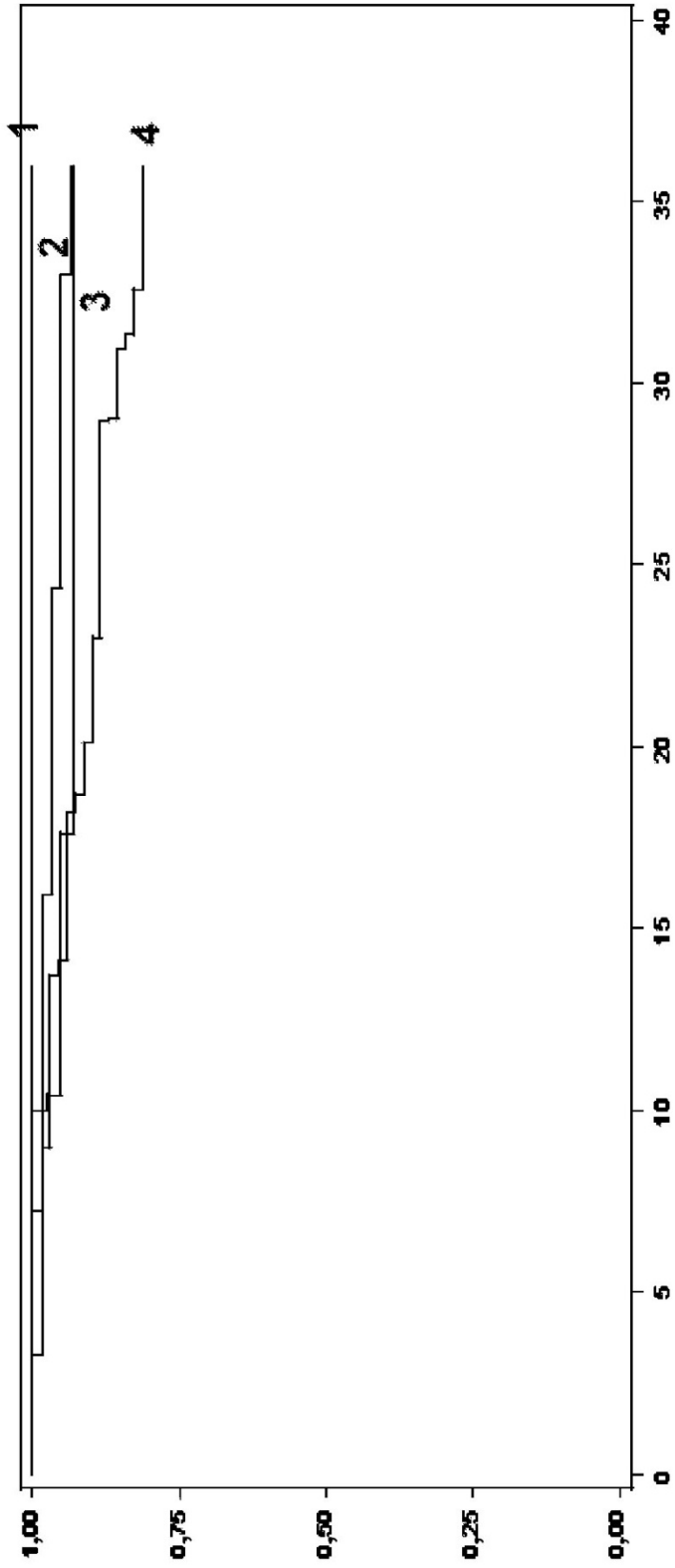


Figura 4

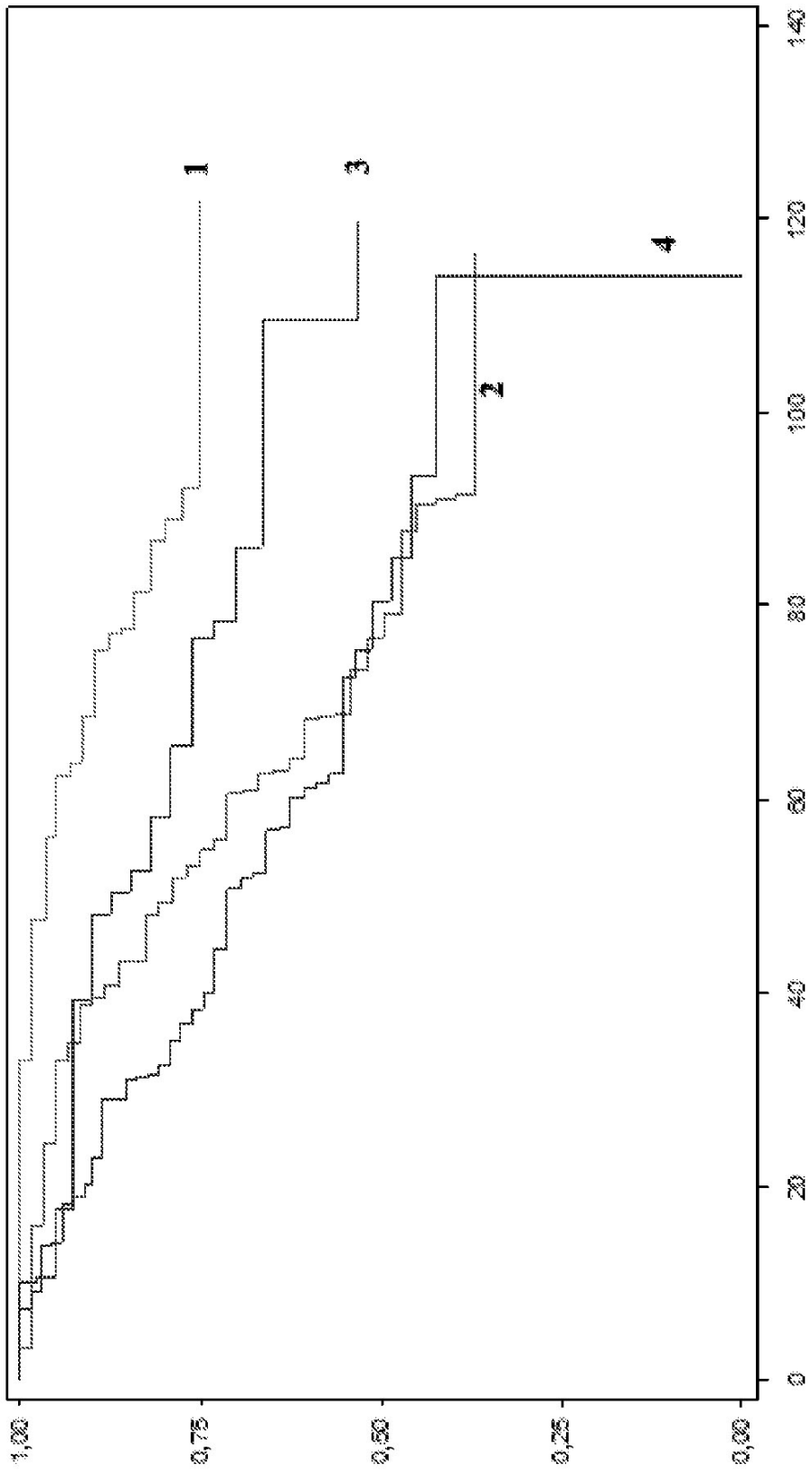


Figura 5

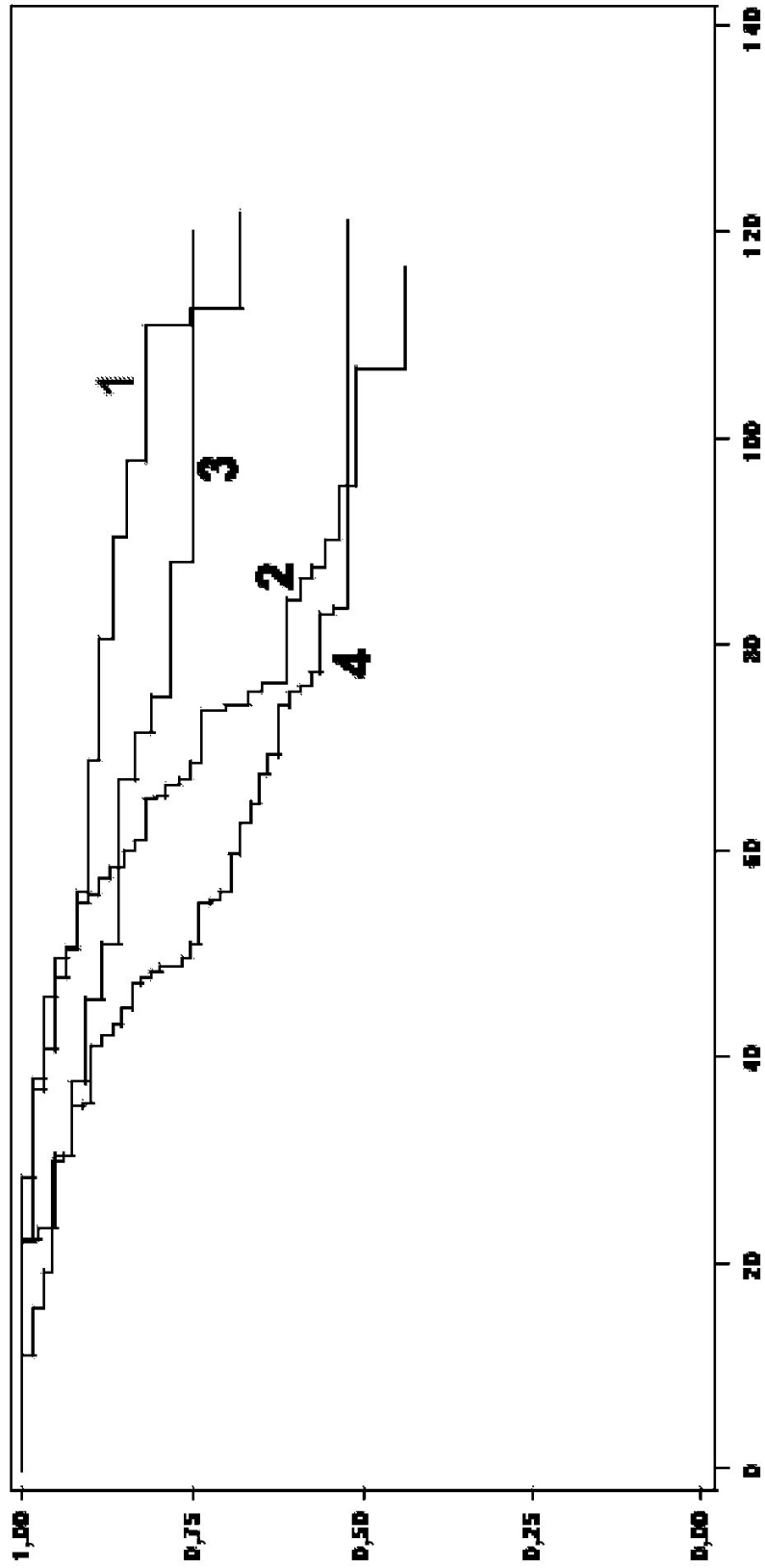


Figura 6