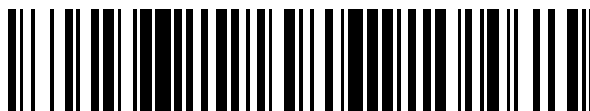


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 048**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/EP2015/056977**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15717821 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3126841**

54 Título: **Biomarcadores para evaluar el VIH**

30 Prioridad:

04.04.2014 EP 14001259

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2020

73 Titular/es:

IDCGS CLINICA DE DIAGNOSTICOS MEDICOS (33.3%)

**Avenida Noe de Azevedo 208 Cj54 Vila Mariana
04117-000 Sao Paulo, BR;**

DIAZ, RICARDO SOBHE (33.3%) y

BIOCRATES LIFE SCIENCES AG (33.3%)

72 Inventor/es:

DA SILVA, ISMAEL DALE COTRIM GUERREIRO;

LOTURCO, EDSON GUIMARAES;

DIAZ, RICOARDO SOUBIE y

KOAL, THERESE

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 749 048 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

Biomarcadores para evaluar el VIH

5 **Campo técnico**

[0001] La presente invención se refiere a nuevos biomarcadores para evaluar el VIH. En particular, la presente invención proporciona nuevos biomarcadores para predecir la respuesta inmunológica a la terapia antirretroviral y el pronóstico de la progresión de la enfermedad de VIH. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar el VIH en un sujeto de mamífero y a un kit para la realización del procedimiento (no reivindicado). Más particularmente, la presente invención está dirigida a nuevos biomarcadores predictivos capaces de identificar pacientes con mayor riesgo de desarrollar una restauración incompleta del sistema inmunitario después del tratamiento antirretroviral, así como pacientes de progresión rápida.

15 **Técnica anterior**Metabólica

[0002] La metabólica es una medición cuantitativa integral de compuestos de bajo peso molecular que cubre sistemáticamente los metabolitos clave, que representan toda la variedad de rutas del metabolismo intermedio. La capacidad para analizar grandes matrices de metabolitos extrae información bioquímica que refleja criterios de valoración funcionales verdaderos de sucesos biológicos evidentes mientras que otras tecnologías genómicas funcionales tales como transcriptómicas y proteómicas, aunque muy valiosas, simplemente indican la causa potencial de la respuesta fenotípica. Por lo tanto, no pueden predecir necesariamente efectos de fármacos, respuesta toxicológica o enfermedades a nivel fenotípico salvo que se añada la validación funcional.

[0003] La metabólica sobrepasa este hueco de información describiendo en particular dicha información funcional, puesto que las diferencias de metabolitos en fluidos biológicos y tejidos proporcionan la conexión más cercana a las diferentes respuestas fenotípicas. No es necesario decir, que dichos cambios en el fenotipo bioquímico tienen un interés directo en las industrias farmacéutica, biotecnológica y de salud, una vez que la tecnología adecuada permita la obtención e integración rentable de esta información.

[0004] En general, el fenotipo no es necesariamente predicho por el genotipo. El hueco entre genotipo y fenotipo lo abarcan muchas reacciones bioquímicas, cada una con dependencias individuales con diferentes influencias, incluyendo fármacos, nutrición y factores ambientales. En esta cadena de biomoléculas desde los genes al fenotipo, los metabolitos son moléculas cuantificables con la conexión más cercana al fenotipo. Muchos estados genotípicos y fenotípicos, tales como una respuesta tóxica a un fármaco o prevalencia de una enfermedad, se predicen por diferencias en las concentraciones de metabolitos funcionalmente relevantes en los fluidos biológicos y tejido.

40 VIH/SIDA

[0005] La infección por el virus de inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA) es una enfermedad del sistema inmunitario humano causado por infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Durante la infección inicial, una persona puede experimentar un periodo breve de enfermedad similar a la gripe. A esto le sigue típicamente un periodo prolongado sin síntomas. Al avanzar la enfermedad, interfiere más y más con el sistema inmunitario, haciendo que la persona tenga muchas más posibilidades de coger infecciones, incluyendo infecciones oportunistas y tumores que normalmente no afectan a personas que tienen sistemas inmunitarios que funcionan. Actualmente no hay cura o vacuna eficaz para el VIH. El tratamiento consiste en terapia antirretroviral (TARV), tal como tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) que ralentiza el avance de la enfermedad y en 2010 más de 6,6 millones de personas lo estaban tomando en países de ingresos bajos y medios.

[0006] El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos creó un sistema de clasificación para el VIH, y lo actualizó en 2008. Este sistema clasifica las infecciones por el VIH basándose en el recuento de CD4 y síntomas clínicos, y describe la infección en tres fases:

Fase 1: recuento de CD4 \geq 500 células/ μ l y sin afecciones que definen el SIDA

Fase 2: recuento de CD4 de 200 a 500 células/ μ l y sin afecciones que definen el SIDA

60 Fase 3: recuento de CD4 \leq 200 células/ μ l o afecciones que definen el SIDA

[0007] Para fines de vigilancia, el diagnóstico del SIDA todavía se mantiene incluso aunque, después de tratamiento, el recuento de linfocitos T CD4+ aumente por encima de 200 por μ l de sangre o se curen otras enfermedades que definen el SIDA.

65 **[0008]** Sin embargo, es cada vez más evidente que el recuento de CD4 y la carga viral no proporcionan una

imagen completa del estado subyacente del sistema inmunitario para los pacientes con VIH. Realmente, la prolongación de la vida como consecuencia de las terapias antirretrovirales ha dado paso a una nueva era de enfermedades no relacionadas con el SIDA y restablecimiento incompleto de la función inmunitaria a pesar del buen control de cargas virales. Por lo tanto, la identificación e incorporación de nuevos marcadores predictivos para el diagnóstico y clasificación del VIH es de la mayor importancia.

[0009] En sitios donde los fármacos antirretrovirales se han usado ampliamente desde mediados de la década de 1990, el uso de la terapia antirretroviral (TARV) ha cambiado el curso natural de la infección por el VIH, mejorando el sistema inmunitario de los pacientes y por lo tanto dando como resultado tanto una menor incidencia de infecciones oportunistas como una mayor supervivencia de los pacientes infectados por el VIH. Los datos recientes muestran que en Brasil ha habido un aumento de la supervivencia entre pacientes diagnosticados con SIDA, logrando el 63,97% de los pacientes una supervivencia de 108 meses. Recientemente, se han hecho varios esfuerzos con el fin de entender la patogénesis del VIH mediante la evaluación de su impacto en células infectadas, en el descubrimiento de biomarcadores de enfermedades y la comprensión de la progresión de la enfermedad por el estudio de subgrupos específicos de pacientes.

[0010] Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de nuevos procedimientos de cribado y diagnóstico, que se puedan llevar a cabo fácilmente y que puedan proporcionar resultados más precisos y eficaces, así como una predicción más fiable de la respuesta del paciente a la TARV.

[0011] Un planteamiento prometedor para el cribado, diagnóstico y clasificación del VIH es el uso de biomarcadores, tales como biomarcadores del plasma (o suero) (tales como antígenos y patrones de proteínas). Sin embargo, están todavía lejos del uso clínico.

[0012] Pendyala G. y Fox HS. (Proteomic and metabolomic strategies to investigate HIV-associated neurocognitive disorders, *Genome Med.* 2010; 2(3): 22) describen biomarcadores de proteínas para trastornos neurocognitivos asociados con el VIH que se han descubierto usando proteómica, que incluyen el complemento C3, superóxido dismutasa soluble y una prostaglandina sintasa. De acuerdo con los autores, marcadores moleculares fiables podrían ayudar en la predicción del desarrollo de la enfermedad.

[0013] Cassol et al. (Plasma metabolomics identifies lipid abnormalities linked to markers of inflammation, microbial translocation, and hepatic function in HIV patients receiving protease inhibitors. *BMC Infectious Diseases* (2013) 13:203) describe que un mapa de firma de 35 metabolitos de metabolismo de lípidos, aminoácidos y nucleótidos, puede distinguir pacientes con VIH con la enfermedad avanzada en la TARV basada en PI de los controles independientemente del estado en el suero del VHC. Los autores concluyen que las alteraciones de lípidos en los pacientes con VIH que reciben TARV basada en PI están conectadas con marcadores de inflamación, traslocación microbiana y función hepática, sugiriendo que las estrategias terapéuticas que atenúan la activación inmunitaria innata desregulada y la disfunción hepática, pueden ser beneficiosas para la prevención y tratamiento de trastornos metabólicos en pacientes con VIH.

[0014] Por lo tanto, hay una necesidad urgente en la técnica de desarrollar nuevas técnicas de cribado y diagnóstico adecuadas para predecir el avance del VIH, desenlace de la enfermedad, así como la respuesta terapéutica del paciente a la terapia antirretroviral (TARV). En particular, se necesitan urgentemente nuevos biomarcadores eficaces para el cribado del VIH que se puedan usar individualmente o en combinación con otros procedimientos existentes.

[0015] En vista de los problemas antes mencionados que existen en la técnica anterior, el objeto subyacente de la presente invención es proporcionar nuevos biomarcadores para evaluar el VIH, cuyos marcadores permitan el diagnóstico fiable del VIH ya en una etapa temprana del avance de la enfermedad. De forma óptima, el marcador debería ser fácilmente detectable en una muestra biológica, tal como la sangre, y su nivel debería estar relacionado consistentemente con la fase del VIH. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para evaluar el VIH en una muestra biológica. Además, los nuevos biomarcadores deberían ser adecuados para predecir la progresión del VIH, desenlace de la enfermedad, así como la respuesta terapéutica del paciente a la terapia antirretroviral.

[0016] Con el fin de resolver los objetos subyacentes de la presente invención, los autores de la invención basaron sus investigaciones en metabolómica, ya que podría dar una visión de los cambios bioquímicos que se producen en el curso del desarrollo del VIH y ofrecer varios biomarcadores nuevos y potencialmente mejores. Los autores de la invención encontraron que se da una imagen más integral de todas las rutas y mecanismos metabólicos implicados en el VIH cuando se usa un panel de metabolitos que son alterados con la progresión del VIH en lugar de usar técnicas realizadas convencionalmente en el sector.

[0017] EP2284540 A1 se refiere a un procedimiento estadístico para predecir la probabilidad de inicio de una insuficiencia orgánica asociada a inflamación de una muestra biológica de un sujeto mamífero in vitro por medio de un perfil de metabolómica cuantitativa de un sujeto que comprende una pluralidad de metabolitos endógenos, y comparándolo con un perfil de metabolómica de referencia cuantitativa de una pluralidad de metabolitos diana

predictivos de la insuficiencia orgánica endógena a efectos de predecir si el sujeto es probable o improbable que desarrolle una insuficiencia de órganos.

5 [0018] Zangerle R. et al., "Increased blood phenylalanina to tyrosine ratio in HIV-1 infection and correction following effective antiretroviral therapy" BRAIN, BEHAVIOR AND IMMUNITY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 24, no. 3, (20100301), páginas 403-408 documentaron mayores niveles en sangre del aminoácido esencial fenilalanina (Phe) en pacientes con infección por VIH-1 y concluyeron que el aumento de phe/tyr es frecuente en pacientes con infección por VIH-1 y se relaciona con la activación inmune, y se encontró que TARV disminuía phe/tyr y este cambio podría indicar e influir en la actividad de PAH.

10 [0019] Zangerle R. et al., "Effective Antiretroviral Therapy Reduces Degradation of Tryptophan in Patients with HIV-1 Infection", CLINICAL IMMUNOLOGY (20020901), Vol. 104, no. 3, páginas 242-247 se refiere a terapia antirretroviral (TARV) que tiene un impacto significativo en niveles de ARN de VIH, el recuento de células CD4 y la activación inmune y examinaron si estos cambios están asociados con un cambio en la velocidad de degradación del triptófano como una estimación de la actividad de la enzima indolamina (2,3)-dioxigenasa (IDO) inducible por interferón γ . Se encontró que tanto la producción de neopterinina como la degradación de triptófano son provocadas por la activación inmune y la degradación de triptófano se incrementa en la infección por VIH y es parcialmente invertida con TAR.

20 Características de la invención

[0020] Por lo tanto, la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona nuevos biomarcadores (es decir, un nuevo conjunto de biomarcadores) adecuados para evaluar la infección por el VIH, en particular en una etapa temprana de la enfermedad. Además, la presente invención también proporciona un procedimiento para evaluar el VIH en un sujeto mamífero.

25 [0021] La invención se dirige al uso de una combinación de metabolitos contenidos en una muestra de sangre, que comprende al menos una fosfatidilcolina que comprende al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae), y al menos los dos aminoácidos tirosina y fenilalanina como un conjunto de biomarcadores para la predicción de la respuesta inmunológica de un sujeto mamífero a la terapia antirretroviral y/o el pronóstico de la progresión de la enfermedad de VIH.

[0022] Además, la presente invención proporciona un procedimiento para la predicción de una respuesta inmunológica de un sujeto mamífero a terapia antirretroviral y/o pronóstico de la progresión de la enfermedad, comprendiendo el procedimiento medir en una muestra de sangre obtenida del sujeto la cantidad de al menos una fosfatidilcolina con al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae) y al menos los dos aminoácidos tirosina y fenilalanina.

[0023] Las realizaciones preferidas de la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes.

40 Breve descripción de las figuras

[0024] En el anexo de la memoria se hace referencia a las siguientes figuras 1-11. Estas muestran ejemplos de acuerdo con la invención (Figuras 8 y 9), así como ejemplos de acuerdo con aspectos de referencia (Figuras 1 a 7, 10 y 11).

45 Figura 1: Análisis de PLS-DA que muestra la clara discriminación entre los pacientes con VIH en fases aguda y crónica, con y sin carga viral detectable, comparado con los controles que incluyen casos de cáncer de mama negativos para el VIH como parte de los controles.

50 Figura 2A: Los 25 metabolitos superiores correlacionados (r de Pearson) con el VIH que muestra que el VIH está básicamente relacionado con disfunciones mitocondriales profundas seguido de una enorme disminución de los niveles de esfingomielinas.

Figura 2B: Aumentos significativos en la glutaminólisis y biosíntesis de lípidos en pacientes con VIH y cáncer de mama comparados con controles sanos. Las infecciones víricas y el cáncer comparten cambios metabólicos de la sangre similares.

Figura 3: El análisis multivariante de curvas ROC (A) usando los metabolitos descritos en (B), demuestra las capacidades discriminativas enormes del ensayo incluso después de 1000 permutaciones.

60 Figura 4: Vista de las probabilidades de clase previstas para discriminar VIH de los controles.

Figura 4B: Análisis de prueba t basada en las concentraciones de metabolitos en la sangre reguladas por aumento y disminución de los pacientes con VIH y los controles. La figura muestra que la esfingomielina C24:1 es casi 100 veces menos concentrada en pacientes con VIH cuando se comparan con los controles.

Figura 4C: Concentraciones de metabolitos en el plasma de dodecanodiolcarinitina (c12-DC), glutaconilcarnitina (C5:1-DC) y esfingomielinas totales (SM totales) en pacientes con VIH y controles.

Figura 5A: La deficiencia de ACADM observada en pacientes con VIH está presente en los mismos niveles en todos los grupos y no cambia significativamente a lo largo del tiempo ($p= 1,3892E-9$, $-\log_{10}(p)= 8,8572$, $FDR= 1,9757E-8$)

Figura 5B: Análisis de correlación de la función de ACADM (C12/C10) con metabolitos en la sangre en el grupo de VIH y de control. Los aumentos en la función de ACADM están seguidos de cerca por aumentos en las esfingomielinas y acilcarnitina C12-DC ambas, significativamente, reguladas por disminución durante la infección por el VIH. Por otra parte, los metabolitos elevados en pacientes con VIH, tales como C5-M-DC y la actividad de la fenilalanina hidroxilasa eran significativamente regulados por disminución.

Figura 6A: La actividad del locus de SYNE2 es mucho menor en pacientes con VIH comparado con los controles sanos, en particular en el grupo de pacientes sin respuesta inmunológica después de 1 año de seguimiento.

Figura 6B: La actividad del locus de SYNE2 es mucho menor en pacientes con VIH, en particular en el grupo de pacientes sin respuesta inmunológica después de 1 año de seguimiento ($p= 1,2959E-7$, $-\log_{10}(p)= 6,8874$, $FDR= 1,5798E-6$) (ANOVA PostHoc) (Leyenda: 1Cont=Controles, 6RID1= pacientes con respuesta inmunológica al inicio, 7RID2= pacientes con respuesta inmunológica después de 1 año, NRID1= pacientes sin respuesta inmunológica al inicio, NRID2= pacientes sin respuesta inmunológica después de 1 año).

Figura 6C: Análisis de correlación de la actividad del locus de SYNE2 (PC aa 28:1/PC ae 40:2) con metabolitos en la sangre en el grupo de VIH y de control. Los aumentos de la función de SYNE2 están seguidos de cerca por aumentos significativos de las esfingomielinas totales y disminuciones significativas en ROS sistémico medido por la proporción de la metionina sulfoxidada con la metionina no modificada total (Met-SO/Met).

Figura 7A: La proporción de PC ae total con PC total, demuestra que, en todos los grupos, pero no en el de pacientes sin respuesta inmunológica, la producción de los lípidos de éter vuelve a niveles normales un año después de la primera consulta. Ocurre lo contrario en el grupo de pacientes sin respuesta inmunológica ($p=1,1405E-5$; $-\log_{10}(p)=4,9429$; $FDR=9,6586E-5$) (ANOVA PostHoc) (Leyenda: 1Cont=Controles, 2ED1= Elite al inicio; 3ED2= Elite después de 1 año; 4PRD1= pacientes que evolucionan rápidamente al inicio; 5PRD2= pacientes que evolucionan rápidamente después de 1 año; 6RID1= pacientes con respuesta inmunológica al inicio, 7RID2= pacientes con respuesta inmunológica después de 1 año, NRID1= pacientes sin respuesta inmunológica al inicio, NRID2= pacientes sin respuesta inmunológica después de 1 año).

Figura 7B: La proporción de PC ae total con PC total, demuestra que en el grupo de pacientes con respuesta inmunológica la producción de lípidos de éter es significativamente regulada por disminución un año después de la primera consulta. Ocurre lo contrario en el grupo de pacientes sin respuesta inmunológica ($p= 3,592E-5$; $-\log_{10}(p)= 4,4447$, $FDR= 3,1709E-4$) (ANOVA PostHoc) (abreviaturas como antes).

Figura 7C: Análisis de correlación de la actividad de AGPS (PC ae total /PC total) con los metabolitos en la sangre en el grupo de VIH y de control. Los aumentos en la función de AGPS están seguidos de cerca por disminuciones en CD4/CD8 y también en la elongasa de ácidos grasos muy largos 2 (ELOVL2) medido por la proporción de PC aa C40:5/PC aa 42:5.

Figura 7D: Comparación de la cantidad de flavoproteína-deshidrogenasa de transferencia de electrones (ETFDH) presente en los respectivos grupos inmunológicos de pacientes (abreviaturas como antes).

Figura 7E: Análisis de correlación de la función de ETFDH (C8/C7-DC) con los metabolitos en la sangre en el grupo de VIH y de control. Los aumentos en la función de ETFDH son seguidos de cerca por aumentos en las esfingomielinas, que eran significativamente reguladas por disminución durante la infección por el VIH. Por otra parte, metabolitos elevados en pacientes con VIH tales como C5-M-DC y la carga viral eran significativamente regulados por disminución.

Figura 8: HIV Pronóstico bueno frente a malo en el VIH: Comparación entre las curvas ROC multivariantes obtenidas en conjuntos de entrenamiento y validación usando los 5 metabolitos predictivos del VIH descritos en la tabla 1. También se presentan los valores pes, después de 100 pasos de permutación.

Figura 9: Gráficos de puntuación bidimensionales de PCA (A) y PLS-DA (B) que representan diferencias en las concentraciones de metabolitos en el plasma (Cont= controles sanos, Nresp = pronóstico peor, Resp= pronóstico mejor).

Figura 10: (A) Correlación de PUFA PC ae/MUFA PC ae con una proporción de recuento de células CD4/DC8; (B) Correlación de PUFA/MUFA con proporción de recuento de células CD4/DC8;

Figura 11: (A) Correlación de PUFA PC ae/SFA PC ae con proporción de recuento de células CD4/DC8; (B)

Correlación de PUFA/SFA con proporción de recuento de células CD4/DC8.

Descripción de las realizaciones preferidas

- 5 **[0025]** Mediante el uso de (el conjunto de) biomarcadores específicos y los procedimientos de acuerdo con la presente invención ha sido posible evaluar de forma más adecuada y fiable el VIH. "Evaluar" en el sentido de la presente invención significa predecir la respuesta inmunológica a una terapia antiretroviral y el pronóstico de la progresión de la enfermedad de VIH, en particular la detección y el marcaje de la enfermedad en las diferentes fases y el control de la progresión de la enfermedad.
- 10 **[0026]** La presente invención permite una predicción más sensible de la progresión de la enfermedad. La presente invención permite además la predicción de la respuesta de un paciente a la TARV y discriminar entre grupos inmunológicos de pacientes. De hecho, los biomarcadores de acuerdo con la presente invención son fácilmente detectables en muestras biológicas, en particular en la sangre, y su nivel está regularmente relacionado con el grado de VIH.
- 15 **[0027]** En general, un biomarcador es una herramienta valiosa debido a la posibilidad de distinguir dos o más estados biológicos entre sí, funcionando como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patógeno o como una reacción a una intervención farmacéutica. Un metabolito es un compuesto de bajo peso molecular (<1 kDa), más pequeño que la mayoría de las proteínas, ADN y otras macromoléculas. Pequeños cambios en la actividad de proteínas producen grandes cambios en las reacciones bioquímicas y sus metabolitos (=biomarcador metabólico, considerando el metabolismo del cuerpo), cuyas concentraciones, flujos y mecanismos de transporte son sensibles a enfermedades e intervención de fármacos. Esto permite conseguir un perfil individual de sustancias fisiológicas y fisiopatológicas, que reflejan tanto los factores genéticos como ambientales, tales como la nutrición, actividad física, microbios intestinales y medicación. Por lo tanto, un biomarcador metabólico da información más integral que, por ejemplo, una proteína u hormona, que son biomarcadores, pero no biomarcadores metabólicos.
- 20 **[0028]** En vista de esto, la expresión biomarcador metabólico ("biomarcador") como se usa en el presente documento se define como un compuesto adecuado como un indicador del estado del VIH, que es un metabolito o compuesto metabólico que se encuentra durante procesos metabólicos en el cuerpo de mamíferos. Los términos "biomarcador", "biomarcador metabólico" y "metabolito" se usan en general como sinónimos en el contexto de la presente invención. En particular, la presencia de una determinada cantidad (típicamente % en masa o % en moles, preferiblemente % en moles) de un metabolito y/o la proporción (de una cantidad) de un metabolito con respecto a (la cantidad de) otro metabolito se usa como "biomarcador" y se usa en la presente invención en los usos y procedimientos como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, el término biomarcador metabólico o biomarcador se pretende que comprenda también las proporciones entre dos o más metabolitos/biomarcadores. Por lo tanto, el término "biomarcador" también puede abarcar la proporción de la cantidad de dos o más metabolitos.
- 30 **[0029]** El biomarcador metabólico (conjunto) medido de acuerdo con la presente invención comprende obligatoriamente las siguientes clases de metabolitos (es decir, analitos): aminoácidos y aminos biogénicas, acilcarnitinas, hexosas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Los lípidos son preferiblemente lípidos de éter araquidónico, preferiblemente los que tienen más de 38 átomos de carbono por molécula. Las definiciones de estas clases son conocidas para los expertos, sin embargo, los miembros preferidos de estas clases se resumen en las tablas 1-5 a continuación. Además, las aminos biogénicas se entienden como un grupo de compuestos biológicamente activos que se encuentran de forma natural, obtenidas por descarboxilación enzimática de los aminoácidos naturales. Una sustancia biogénica es una sustancia proporcionada por procesos de la vida, y las aminos biogénicas contienen un grupo amina.
- 40 **[0030]** Se ha encontrado sorprendentemente que la medición de un conjunto de marcadores que comprende estas clases de metabolitos, permite una predicción más sensible de la progresión del VIH, así como la predicción de la respuesta terapéutica del paciente a la TARV.
- 45 **[0031]** Si se omite una clase de metabolitos de este grupo o si se reduce su número, la evaluación del VIH se hace menos sensible y menos fiable. Esto se aplica en particular para las fases tempranas de la enfermedad, no siendo detectables de forma fiable en absoluto de acuerdo con procedimientos conocidos usando biomarcadores conocidos. De hecho, la medición de los metabolitos descritos en el presente documento al mismo tiempo, permite un diagnóstico más fiable del VIH, preferiblemente con una sensibilidad de 100%. Este hecho ni se ha descrito ni se ha hecho obvio en la técnica anterior.
- 50 **[0032]** La muestra biológica se obtiene de un mamífero, preferiblemente de un ratón, una rata, una cobaya, un perro, un cerdo, un minicerdo, o un ser humano, preferiblemente un ser humano. La muestra biológica preferiblemente es una muestra de sangre. La muestra de sangre típicamente es sangre entera, suero o plasma, en la que se prefiere el plasma sanguíneo. Sin embargo, también es adecuado cualquier otra muestra biológica conocida para el experto en la materia que permite las mediciones de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención es un procedimiento in vitro.
- 60 **[0032]** La muestra biológica se obtiene de un mamífero, preferiblemente de un ratón, una rata, una cobaya, un perro, un cerdo, un minicerdo, o un ser humano, preferiblemente un ser humano. La muestra biológica preferiblemente es una muestra de sangre. La muestra de sangre típicamente es sangre entera, suero o plasma, en la que se prefiere el plasma sanguíneo. Sin embargo, también es adecuado cualquier otra muestra biológica conocida para el experto en la materia que permite las mediciones de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención es un procedimiento in vitro.
- 65

[0033] Para la medición de las concentraciones de metabolitos en la muestra biológica se usa un procedimiento analítico cuantitativo tal como cromatografía, espectroscopía y espectrometría de masas, aunque se prefiere en particular la espectrometría de masas. La cromatografía puede comprender GC, LC, HPLC y UPLC; la espectroscopía puede comprender UV/Vis, IR y RMN; y la espectrometría de masas puede comprender ESI-QqQ, ESI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF, y MALDI-TOF/TOF. Se prefiere el uso de espectrometría de masas en tándem con FIA y HPLC. Los procedimientos analíticos son conocidos en general para el experto en la materia.

[0034] Más preferiblemente, los analizadores/espectrometría de masas comprenden analizador de masas de cuadrupolo, analizador de masas de trampa iónica, analizador de masas de TOF (tiempo de vuelo), analizador de masas Orbitrap, analizador de masas de sector magnético, analizador de masas de sector electrostático, resonancia ciclotrónica de iones (ICR) y combinaciones de los analizadores de masa, incluyendo cuadrupolo simple (Q) y triple cuadrupolo (QqQ), QqTOF, TOF-TOF, Q-Orbitrap.

[0035] Para medir las cantidades de metabolitos objetivo se usa la metabolómica para cuantificar los metabolitos en la muestra biológica incluyendo las clases de analitos de aminoácidos, aminos biogénicas, acilcarnitinas, hexosas, esfingolípidos y gliceroesfingolípidos. Los aminoácidos incluyen preferencialmente los 20 aminoácidos proteínogénicos conocidos. La cuantificación se realiza usando la presencia de patrones internos con marcaje isotópico y se determina mediante los procedimientos descritos anteriormente.

[0036] Una lista de analitos incluyendo sus abreviaturas (códigos BC) que son adecuados como metabolitos que se van a medir de acuerdo con la memoria se indica en las siguientes tablas (los metabolitos a medir según la invención se definen en las reivindicaciones 1-5).

[0037] La clasificación de metabolito mediante el código BC es tal como se explica en EP 2284540 A1 utilizando las siguientes abreviaturas:

Acilcarnitinas (C longitud de cadena: número total de dobles enlaces) por ejemplo, C14:1
Esfingomielinas (SM longitud de cadena: número total de dobles enlaces) por ejemplo, SM 16:0
Fosfatidilcolinas (PC)
Monoacilfosfatidilcolinas (PC una longitud de cadena: número total de dobles enlaces) por ejemplo, PC a C 18:2
Diacilfosfatidilcolinas (PC aa longitud de cadena: número total de dobles enlaces) por ejemplo PC aa 28:1
Acilalquilfosfatidilcolinas (PC ae longitud de cadena: número total de dobles enlaces) por ejemplo PC ae C40:1
Ácido graso poliinsaturado (PUFA)
Ácido graso monoinsaturado (MUFA)
Ácido graso saturado (SFA)

Tabla 1: Aminoácidos y aminos biogénicas (µM)

código BC	Analito
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Cit	Citrulina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Orn	Ornitina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Ac-Orn	Acetilornitina
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
SDMA	Dimetilarginina simétrica
DMA total	Dimetilarginina total
alfa-AAA	Ácido alfa-Aminoadípico

código BC	Analito
Carnosina	Carnosina
Creatinina	Creatinina
Histamina	Histamina
Quinurenina	Quinurenina
Met-SO	Metioninasulfóxido
Nitro-Tyr	Nitrotirosina
OH-Pro	Hidroxiprolina
PEA	Feniletilamina
Putrescina	Putrescina
Sarcosina	Sarcosina
Serotonina	Serotonina
Espermidina	Espermidina
Espermina	Espermina
Taurina	Taurina

Tabla 2: Acilcarnitina (μM)

código BC	Analito
C0	Carnitina
C2	Acetilcarnitina
C3	Propionilcarnitina
C3:1	Propenoilcarnitina
C3-OH	Hidroxipropionilcarnitina
C4	Butirilcarnitina
C4:1	Butenilcarnitina
C4-OH (C3-DC)	Hidroxibutirilcarnitina
C5	Valerilcarnitina
C5:1	Tigililcarnitina
C5:1-DC	Glutaconilcarnitina
C5-DC (C6-OH)	Glutarilcarnitina* (Hidroxihexanoilcarnitina)
C5-M-DC	Metilglutarilcarnitina
C5-OH (C3-DC-M)	Hidroxi valerilcarnitina (Metilmalonilcarnitina)
C6 (C4:1-DC)	Hexanoilcarnitina (Fumarilcarnitina)
C6:1	Hexenoilcarnitina
C7-DC	Pimelilcarnitina
C8	Octanoilcarnitina
C9	Nonoilcarnitina
C10	Decanoilcarnitina
C10:1	Decenoilcarnitina
C10:2	Decadienilcarnitina
C12	Dodecanoilcarnitina
C12:1	Dodecenoilcarnitina
C12-DC	Dodecanedioilcarnitina
C14	Tetradecanoilcarnitina
C14:1	Tetradecenoilcarnitina
C14:1-OH	Hidroxitetradecenoilcarnitina
C14:2	Tetradecadienilcarnitina
C14:2-OH	Hidroxitetradecadienilcarnitina
C16	Hexadecanoilcarnitina
C16:1	Hexadecenoilcarnitina
C16:1-OH	Hidroxihexadecenoilcarnitina
C16:2	Hexadecadienilcarnitina
C16:2-OH	Hidroxihexadecadienilcarnitina
C16-OH	Hidroxihexadecanoilcarnitina
C18	Octadecanoilcarnitina
C18:1	Octadecenoilcarnitina
C18:1-OH	Hidroxioctadecenoilcarnitina
C18:2	Octadecadienilcarnitina
C10:1	Decenoilcarnitina
C10:2	Decadienilcarnitina
C12	Dodecanoilcarnitina
C12:1	Dodecenoilcarnitina
C12-DC	Dodecanedioilcarnitina

ES 2 749 048 T3

código BC	Analito
C14	Tetradecanoilcarnitina
C14:1	Tetradecenoilcarnitina
C14:1-OH	Hidroxitetradecenoilcarnitina
C14:2	Tetradecadienilcarnitina
C14:2-OH	Hidroxitetradecadienilcarnitina
C16	Hexadecanoilcarnitina

Tabla 3: Hexosas (mM)

código BC	Analito
H1	Hexosa

Tabla 4: Esfingolípidos

código BC	Analito
SM (OH) C14:1	Hidroxiesfingomielina con suma de restos acilo C14:1
SM (OH) C16:1	Hidroxiesfingomielina con suma de restos acilo C16:1
SM (OH) C22:1	Hidroxiesfingomielina con suma de restos acilo C22:1
SM (OH) C22:2	Hidroxiesfingomielina con suma de restos acilo C22:2
SM (OH) C24:1	Hidroxiesfingomielina con suma de restos acilo C24:1
SM C16:0	esfingomielina con suma de restos acilo C16:0
SM C16:1	esfingomielina con suma de restos acilo C16:1
SM C18:0	esfingomielina con suma de restos acilo C18:0
SM C18:1	esfingomielina con suma de restos acilo C18:1
SM C20:2	esfingomielina con suma de restos acilo C20:2
SM C22:3	esfingomielina con suma de restos acilo C22:3
SM C24:0	esfingomielina con suma de restos acilo C24:0
SM C24:1	esfingomielina con suma de restos acilo C24:1
SM C26:0	esfingomielina con suma de restos acilo C26:0
SM C26:1	esfingomielina con suma de restos acilo C26:1

Tabla 5: Gliceroesfingolípidos (mM)

código BC	Analito
lysoPC a C14:0	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C14:0
lysoPC a C16:0	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C16:0
lysoPC a C16:1	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C16:1
lysoPC a C17:0	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C17:0
lysoPC a C18:0	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C18:0
lysoPC a C18:1	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C18:1
lysoPC a C18:2	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C18:2
lysoPC a C20:3	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C20:3
lysoPC a C20:4	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C20:4
lysoPC a C24:0	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C24:0
lysoPC a C26:0	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C26:0
lysoPC a C26:1	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C26:1
lysoPC a C28:0	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C28:0
lysoPC a C28:1	Lisofosfatidilcolina con resto acilo C28:1
PC aa C24:0	Fosfatidilcolina con suma de restos diacilo C24:0
PC aa C26:0	Fosfatidilcolina con suma de restos diacilo C26:0
PC aa C28:1	Fosfatidilcolina con suma de restos diacilo C28:1
PC aa C30:0	Fosfatidilcolina con suma de restos diacilo C30:0
PC aa C30:2	Fosfatidilcolina con suma de restos diacilo C30:2
PC aa C32:0	Fosfatidilcolina con suma de restos diacilo C32:0
PC aa C32:1	Fosfatidilcolina con suma de restos diacilo C32:1

PC ae C42:4	Fosfatidilcolina con suma de restos acilo-alquilo C42:4
PC ae C42:5	Fosfatidilcolina con suma de restos acilo-alquilo C42:5
PC ae C44:3	Fosfatidilcolina con suma de restos acilo-alquilo C44:3
PC ae C44:4	Fosfatidilcolina con suma de restos acilo-alquilo C44:4
PC ae C44:5	Fosfatidilcolina con suma de restos acilo-alquilo C44:5
PC ae C44:6	Fosfatidilcolina con suma de restos acilo-alquilo C44:6

[0038] Se describen más realizaciones preferidas de la presente invención a continuación. Sin embargo, su combinación con características descritas antes no pretende excluirse.

5 Cribado/diagnóstico de pacientes (realización de referencia)

[0039] En una realización de referencia, los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores, tal como se describen en el presente documento, se utilizan para el cribado de pacientes que potencialmente sufren de VIH y el diagnóstico del VIH en estos pacientes. Sorprendentemente, se ha encontrado útil para el cribado y/o diagnóstico rápido, fácil y con alto rendimiento de un gran número de pacientes con una mayor precisión de los resultados. De este modo, en esta realización de referencia, evaluar comprende el cribado y diagnóstico de la infección por VIH en un sujeto mamífero, preferiblemente en un ser humano. En particular, es posible cribar/diagnosticar la enfermedad en sujetos independientes de la actividad del virus, es decir, de forma asintomática.

[0040] De este modo, en una realización de referencia, la descripción está dirigida al uso de una combinación de los metabolitos contenidos en una muestra de sangre, que comprenden al menos una acilcarnitina (AC) y al menos una esfingomielina (SM) como un conjunto de biomarcadores para el cribado y/o el diagnóstico del VIH y un procedimiento para el cribado y/o el diagnóstico del VIH en un sujeto mamífero, comprendiendo el procedimiento medir en una muestra de sangre obtenida del sujeto la cantidad de al menos una acilcarnitina (AC) y al menos una esfingomielina (SM).

[0041] En particular, es posible discriminar entre sujetos que sufren de VIH y controles sanos, es decir, sujetos no infectados por el VIH, mediante el uso de la combinación anterior de metabolitos.

[0042] Preferiblemente, la al menos una acilcarnitina se selecciona de entre las incluidas en la Tabla 2 que se muestra anteriormente. Más preferiblemente, la al menos una esfingomielina se selecciona de entre las incluidas en la Tabla 4 anterior. Más preferiblemente, la al menos una acilcarnitina se selecciona de glutaconilcarnitina, metilglutarilcarnitina, octanoilcarnitina, decanoilcarnitina y dodecanoilcarnitina.

[0043] Más preferiblemente, el procedimiento comprende medir la cantidad de al menos una amina biogénica y/o de al menos una fosfatidilcolina.

[0044] Más preferiblemente, el procedimiento comprende medir la cantidad de al menos una esfingomielina, en particular medir la proporción de la cantidad de hidroxiesfingomielina con suma de residuos de acilo de C24:1 (SM (OH) C24:1) con respecto a la cantidad de esfingomielina con suma de residuos de acilo de C16:0 (SM C16:0).

[0045] La medición de cantidades adicionales de los metabolitos y/o proporciones adicionales de metabolitos que se enumeran en las Tablas 6 y 7 a continuación mejorará aún más la exactitud de discriminación entre estos sujetos y por lo tanto mejorará la precisión de los resultados de cribado y/o diagnóstico.

Tabla 6: Metabolitos preferidos usados para el cribado y el diagnóstico de VIH en sujetos (códigos BC como en las Tablas 1-5):

Código BC	Correlación con VIH	Test t	Valor p	FDR
C5-M-DC	-0,87409	18,872	0,0	0,0
C5:1-DC	0,89539	21,09	0,0	0,0
SM C24:1	-0,95188	-32,575	2,5393E-58	1,9552E-56
SM total	-0,95159	-32,472	3,4828E-58	2,0113E-56
C12-DC	-0,95012	-31,952	1,7345E-57	8,0133E-56
SM C24:0	-0,9485	-31,403	9,6892E-57	3,7303E-55
DOPA	-0,94487	-30,265	3,6992E-55	1,2207E-53
SM (OH) C22:2	-0,94426	-30,082	6,7198E-55	1,9404E-53
SM C16:1	-0,93958	-28,787	4,9442E-53	1,269E-51
SM (OH) C22:1	-0,93507	-27,668	2,2957E-51	5,3031E-50
SM C16:0	-0,93453	-27,541	3,5697E-51	7,4963E-50
SM C18:0	-0,93053	-26,65	8,3282E-50	1,6032E-48
SM C18:1	-0,92956	-26,444	1,7486E-49	3,1072E-48
SM (OH) C16:1	-0,91534	-23,841	2,9075E-45	4,7973E-44

SM (OH) C24:1	-0,90472	-22,274	1,4376E-42	2,2139E-41
SM (OH) C14:1	-0,90051	-21,72	1,3825E-41	1,996E-40
SM C20:2	-0,89379	-20,902	4,1646E-40	5,6589E-39
SM C26:1	-0,86386	-17,986	1,5307E-34	1,9644E-33
Nitro-Tyr	-0,7976	-13,869	6,698E-26	8,1434E-25
C12	-0,70686	-10,481	3,0712E-18	3,5473E-17
C8:1	-0,70251	-10,353	6,0361E-18	6,6397E-17
PC ae C30:2	-0,66854	-9,4285	7,992E-16	8,3916E-15
Sarcosina	-0,66406	-9,3151	1,4523E-15	1,4586E-14
C5-OH (C3-DC-M)	-0,64923	-8,9525	9,7584E-15	9,3924E-14
PC ae C30:0	-0,64339	-8,8146	2,0084E-14	1,8558E-13

Tabla 7: Proporciones preferidas de metabolitos utilizados para el cribado y el diagnóstico de VIH en sujetos (códigos BC como en las Tablas 1-5, AUC: área bajo la curva característica de funcionamiento del receptor (ROC):

Proporciones de metabolitos	AUC	Valor p
C5-M-DC/SM totales	1,0	2,7246E-63
C5-M-DC/OH-SM totales	1,0	1,2081E-62
C5-M-DC/No OH-SM totales	1,0	1,074E-62
C5-M-DC/SFA (SM)	1,0	9,1734E-62
C5-M-DC/MUFA (SM)	1,0	4,6149E-64
C5-M-DC/PUFA (SM)	1,0	1,9734E-63
C5:1-DC/C12-Dc	1,0	2,4417E-61
C5:1-DC/SM totales	1,0	5,9247E-68
C5:1-DC/ OH-SM totales	1,0	2,1547E-64
C5:1-DC/ No OH-SM totales	1,0	6,0825E-68
C5:1-DC/SFA (SM)	1,0	1,2281E-66
C5:1-DC/MUFA (SM)	1,0	1,1064E-68
C5:1-DC/PUFA (SM)	1,0	7,2444E-66
SM totales/PUFA PC aa	1,0	6,4861E-62
No OH SM totales/PUFA PC aa	1,0	4,9571E-60
MUFA (SM)/PUFA PC ae	1,0	2,641E-60
MUFA (SM)/PUFA PC aa	1,0	4,07E-63
MUFA (SM)/No ARAC PC aa	1,0	8,6339E-61
PUFA (SM)/PUFA PC aa	1,0	7,2335E-62

5

[0046] Lo más preferiblemente, los metabolitos se seleccionan de entre los enumerados en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8: Otros metabolitos preferidos utilizados para el cribado y el diagnóstico de VIH en sujetos (códigos BC como en las Tablas 1-5):

Código BC	AUC	Valor p
No-OH SM totales	1,0	1,5679E-53
MUFA (SM)	1,0	6,8445E-55
DOPA	1,0	1,4394E-42
SM totales	1,0	8,6517E-54
PUFA (SM)	1,0	2,4587E-51
C12-DC	1,0	1,7105E-53
OH-SM totales	1,0	3,3558E-49
SFA (SM)	1,0	2,4079E-51
C5-M-DC	0,99963	4,5771E-41
C5:1-DC	0,99963	4,358E-45
Nitro-Tyr	0,94595	8,7656E-21

[0047] Opcionalmente, el procedimiento comprende la etapa adicional de identificar sobre la base de las cantidades y proporciones medidas para los biomarcadores y proporciones de biomarcadores respectivos, aquellos sujetos que sufren de VIH y además preferiblemente tratar el VIH en estos sujetos mediante TARV, tal como la TARGA.

15

[0048] Como el procedimiento de esta realización puede llevarse a cabo a partir de muestras de sangre, el procedimiento aumenta ampliamente la complacencia del sujeto en comparación con la técnica de cribado de la técnica anterior. En particular, el procedimiento aumenta ampliamente la fiabilidad y la sensibilidad de los resultados del cribado, en particular, reduce el número de resultados falsos positivos y falsos negativos, y emplea menos tiempo y, por lo tanto, se puede realizar con un elevado número de pacientes.

20

Predicción de la respuesta inmunológica a la terapia antirretroviral y pronóstico del VIH

- 5 [0049] En la presente invención, los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores de la presente invención se usan para predecir si un paciente que sufre de VIH es probable que responda a la terapia antirretroviral (TARV), por ejemplo la terapia antirretroviral de alta actividad (TARGA). En esta realización, el paciente de VIH es típicamente un paciente que no ha sido sometido al tratamiento del VIH, preferiblemente un paciente que no ha sido sometido al tratamiento del VIH mediante TARV. De este modo, los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores de la presente invención se usan para predecir si un paciente que sufre de VIH es probable que responda a la terapia antirretroviral (TARV) antes de comenzar la terapia.
- 10 [0050] En particular, se puede discriminar entre sujetos con buena respuesta (buen pronóstico) y sujetos con una peor respuesta (peor pronóstico). Típicamente, un sujeto con buen pronóstico comprende controladores de élite (EC) y sujetos con respuesta inmunológica (IR), mientras que el sujeto con una peor respuesta comprende sujetos sin respuesta inmunológica (INR) y de progresión rápida (RP).
- 15 [0051] Los controladores de élite son pacientes infectados por VIH capaces de controlar la replicación del virus a un nivel de <50 copias/ml durante al menos un año sin el uso de TARGA.
- [0052] Los sujetos con respuesta inmunológica son pacientes que se caracterizan por una respuesta eficaz con respecto al recuento de células T CD4+ y de carga viral del VIH, es decir, tienen una carga viral (viremia) indetectable y altos niveles de células T CD4+, incluso después de largos períodos de TARGA.
- 20 [0053] Los sujetos sin respuesta inmunológica son pacientes que se caracterizan por una respuesta discordante e ineficaz con respecto al recuento de células T CD4+ y de carga viral del VIH, es decir, tienen una carga viral (viremia) indetectable, pero persisten con bajos niveles de células T CD4+ incluso después de largos períodos de TARGA.
- 25 [0054] Los sujetos de progresión lenta son pacientes infectados por VIH que mantienen niveles estables de células T CD4+ y que permanecen asintomáticos sin el uso de la terapia TARGA.
- 30 [0055] Por lo tanto, en una realización preferida, la invención se dirige al uso de una combinación de metabolitos descritos a continuación para predecir si un sujeto mamífero que sufre de VIH es probable que respondan a TARV, por ejemplo, terapia TARGA.
- 35 [0056] En particular, la presente invención se dirige además al uso de una combinación de metabolitos contenidos en una muestra de sangre, que comprende al menos una fosfatidilcolina que comprende al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae), y al menos dos aminoácidos como un conjunto de biomarcadores para la predicción de la respuesta inmunológica de un sujeto mamífero a la terapia antirretroviral y/o el pronóstico de progresión de la enfermedad. En una realización adicional, la presente invención está dirigida a un procedimiento para la predicción de la respuesta inmunológica de un sujeto mamífero a la terapia antirretroviral y/o el pronóstico de la progresión de la enfermedad del VIH, comprendiendo el procedimiento medir en una muestra de sangre obtenida del sujeto la cantidad de al menos una fosfatidilcolina con al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae) y al menos dos aminoácidos.
- 40 [0057] Preferiblemente, la al menos una fosfatidilcolina con al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae) se selecciona de entre las incluidas en la Tabla 5 de la memoria.
- [0058] Los al menos dos aminoácidos son Tyr y Phe.
- 50 [0059] Más preferiblemente, el procedimiento comprende medir la cantidad de al menos una acilcarnitina. La al menos una acilcarnitina se selecciona preferiblemente de las incluidas en la Tabla 2 de la memoria.
- [0060] Lo más preferiblemente, el procedimiento comprende medir en la muestra de sangre la proporción de
- 55 a) AC-DC/C3-OH total,
 b) Tyr/Phe/PC ae C38:4,
 c) Tyr/Phe/PC ae C40:6,
 d) C3-OH/C14:2-OH, y
 e) Tyr/Phe/suma Arac PC ae.
- 60 [0061] Sorprendentemente, se encontró en la presente invención que predecir la respuesta terapéutica a TARV utilizando la combinación anterior de proporciones de metabolitos era más fiable y eficaz que con los procedimientos de la técnica anterior.
- 65 [0062] Además, se ha encontrado sorprendentemente en la presente invención que es posible discriminar entre subgrupos de pacientes y predecir la respuesta inmunológica a TARV en base a su relación distintiva (firma) de metabolitos. Por lo tanto, se puede discriminar entre los subtipos inmunológicos de controladores de élite (CE) y los

sujetos con respuesta inmunológica (IR) frente al grupo de sujetos de progresión rápida (RP) y sujetos sin respuesta inmunológica (NIR), en base a la biofirma metabólica de la enfermedad del VIH en estos pacientes. La discriminación entre estos grupos de pacientes inmunológicos puede aumentar aún más la precisión de la predicción de la respuesta terapéutica a TARV, y por lo tanto puede mejorar ampliamente el éxito terapéutico. En particular, el

5 Grupo de buen pronóstico está compuesto de pacientes de Controladores de élite y de sujetos con respuesta inmunológica, que son los pacientes con la mayor probabilidad de sobrevivir mucho tiempo. El Grupo de peor pronóstico está compuesto de los pacientes que desarrollan SIDA en menos de 1 o 2 años (sujetos de progresión rápida) o no mostraban recuperación de la inmunidad, según lo revelado por los niveles inferiores de CD4/CD8, después del tratamiento antirretroviral. En particular, es posible recibir un pronóstico preciso de la progresión de la

10 enfermedad y de la respuesta inmunológica independiente del estado de la enfermedad en el momento de realizar los procedimientos de la presente invención.

[0063] La medición de cantidades adicionales de los metabolitos y/o proporciones adicionales de metabolitos que se enumeran en las Tablas 9 y 10 mejorará aún más la exactitud de la discriminación entre estos grupos inmunológicos

15 y por lo tanto mejorará la precisión de la predicción de la respuesta terapéutica a ART, tal como TARGA.

Tabla 9: Metabolitos que discriminan los controladores de élite (ER) de los grupos inmunológicos NIR, IR y RP

Código BC	AUC	Valor P
Met	0,94643	0,017092
Gln	0,91071	0,03196
Tyr	0,91071	0,0053004
C6:1	0,91071	0,026148
Glico/Gluta	0,89286	0,042728
alfa-AAA	0,89286	0,03133
C3	0,89286	0,011261
AA esencial	0,875	0,014459
Lys	0,875	0,050259
Trp	0,875	0,017911

20 Tabla 10: Proporciones de metabolitos que discriminan los controladores de élite (ER) de los grupos inmunológicos NIR, IR y RP

Código BC	AUC	Valor P
Glu/Tyr	1,0	7,6051E-5
Tyr/PC aa C40:1	1,0	2,162E-4
Tyr/PC aa C40:4	1,0	2,3559E-5
Tyr/PC aa C40:5	1,0	1,1624E-5
Tyr/PC aa C42:4	1,0	1,631E-4
PC aa C36:0/PC aa C42:4	1,0	1,4343E-5
PC aa C36:0/PC aa C40:3	1,0	1,3387E-4
PC aa C36:0/PC aa C40:4	1,0	1,3076E-6
PC aa C36:0/PC aa C44:3	1,0	2,2717E-4
PC aa C32:2/PC aa C40:4	1,0	2,2265E-4
PC aa C40:1/PC aa C40:4	1,0	2,2424E-5
Tyr/PC ae C30:2	0,98214	2,1209E-4
Tyr/PC ae C42:5	0,98214	1,3096E-4
PC aa C36:0/PC aa C40:1	0,98214	2,0831E-4
PC aa C36:0/PC aa C36:1	0,98214	1,3905E-4
PC aa C36:0/PC aa C38:3	0,98214	1,1414E-4
PC aa C36:5/PC aa C40:4	0,98214	6,0499E-5
PC aa C42:2/PC aa C40:4	0,96429	1,584E-4
Glu/Tyr	1,0	7,6051E-5
Tyr/PC aa C40:1	1,0	2,162E-4
Tyr/PC aa C40:1	1,0	2,3559E-5

Control de la actividad de la enfermedad por VIH (realización de referencia)

25

[0064] Además, con los metabolitos citados anteriormente es posible controlar la actividad de la enfermedad del VIH en un paciente.

[0065] De este modo, en una realización de referencia, la divulgación se dirige al uso de una combinación de

30 metabolitos contenidos en una muestra de sangre que comprende al menos la proporción de la cantidad total de lípidos de éter poliinsaturado araquidónico con la cantidad total de lípidos de éter de ácido graso monoinsaturado y

la proporción de la cantidad total de lípidos de éter de ácido graso monoinsaturado con la cantidad total de ácidos grasos saturados, como un conjunto de biomarcadores para el control de la actividad del VIH en un sujeto mamífero.

- 5 **[0066]** Una realización de referencia adicional se dirige a un procedimiento para controlar la actividad del VIH en un sujeto mamífero, comprendiendo el procedimiento medir en una muestra de sangre obtenida del sujeto, al menos la proporción de la cantidad total de lípidos de éter poliinsaturado araquidónico con la cantidad total de lípidos de éter de ácido graso monoinsaturado y la proporción de la cantidad total de lípidos de éter de ácido graso monoinsaturado con la cantidad total de ácidos grasos saturados.
- 10 **[0067]** En realizaciones de referencia preferidas, el lípido de éter poliinsaturado araquidónico es ácido graso poliinsaturado (PUFA) PC ae, el lípido de éter de ácido graso monoinsaturado es ácido graso monoinsaturado (MUFA) PC ae y el ácido graso saturado es ácido graso saturado (SFA) PC ae. Por lo tanto, las proporciones preferidas comprenden PUFA PC ae/MUFA PC ae y/o PUFA PC ae/SFA PC ae.
- 15 **[0068]** El procedimiento preferiblemente comprende además medir la cantidad de al menos una acilcarnitina y/o medir la cantidad de al menos una esfingomielina.
- 20 **[0069]** Más preferiblemente, la al menos una acilcarnitina se selecciona de las incluidas en la tabla 2 de la memoria y/o la al menos una esfingomielina se selecciona de las incluidas en la tabla 4 de la memoria, respectivamente.
- 25 **[0070]** Si se omite una clase de metabolitos de este grupo o si se reduce su número, el control de la actividad de la enfermedad por el VIH resulta menos sensible y menos fiable. Esto se aplica en particular para las fases tempranas de la enfermedad que no son detectables de forma fiable en absoluto de acuerdo con procedimientos conocidos usando biomarcadores conocidos. De hecho, la medición de la combinación de metabolitos descritos en el presente documento al mismo tiempo permite un control más preciso y más fiable de la actividad del VIH, típicamente con una sensibilidad de preferiblemente más del 80%, más preferiblemente más del 90%, todavía más preferible más del 98% y lo más preferiblemente del 100%. Dicho hecho ni se ha descrito ni resulta obvio a partir de la técnica anterior.
- 30 **[0071]** Además, los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores de la presente divulgación tal como se describen en el presente documento, permiten un control más fiable y preciso de la actividad del VIH con una especificidad de más del 80%, más preferiblemente más del 85%, todavía más preferiblemente más del 90% y lo más preferiblemente del 100%.
- 35 **[0072]** Además, el conjunto de biomarcadores de la presente divulgación tal como se describe en el presente documento, permite un control más fiable de la actividad del VIH con un valor predictivo positivo (VPP) de más del 40%, más preferiblemente más del 50%, todavía más preferiblemente más del 60% y lo más preferiblemente más del 80%.
- 40 **[0073]** Además, el conjunto de biomarcadores de la presente divulgación tal como se describe en el presente documento, permite un control más fiable de la actividad del VIH con un valor predictivo negativo (VPN) de más del 80%, más preferiblemente más del 90%, todavía más preferiblemente más del 98% y lo más preferiblemente del 100%.
- 45 **[0074]** En una realización preferida, el conjunto de biomarcadores de la presente divulgación tal como se describe en el presente documento, permite un control más fiable de la actividad del VIH con una sensibilidad del 100% y un VPN del 100%.
- 50 **[0075]** En una realización más preferida, el conjunto de biomarcadores de la presente divulgación tal como se describe en el presente documento, permite un control más fiable de la actividad del VIH con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 85% o más y un VPN del 100%.
- 55 **[0076]** En una realización más preferida, el conjunto de biomarcadores de la presente divulgación tal como se describe en el presente documento, permite un mayor control de la actividad del VIH con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 90% o más, un VPP del 80% o más y un VPN del 100%.
- 60 **[0077]** En la realización más preferida, el conjunto de biomarcadores de la divulgación tal como se describe en el presente documento, permite un control más fiable de la actividad del VIH con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 100%, un VPP del 100% y un VPN del 100%.
- 65 **[0078]** En particular, con los biomarcadores (conjunto de) tal como se describen en el presente documento, es posible no solo distinguir con precisión entre la fase aguda de la infección por el VIH, es decir, la actividad de la enfermedad caracterizada por una carga viral alta, y la fase crónica, es decir, el virus del VIH continua reproduciéndose a niveles muy bajos, aunque todavía está activo, de la infección, sino que también se obtiene información de la actividad bioquímica de la enfermedad, tal como información de los niveles de biooxidación,

función mitocondrial, inmunidad, metabolismo de lípidos y/o resistencia a la insulina. Un marcador típico de la actividad de la enfermedad y la progresión de la enfermedad es el recuento de células de linfocitos CD4. Por lo tanto, la actividad de la enfermedad y la progresión de la enfermedad se pueden determinar de manera eficaz en la presente invención mediante la determinación de la correlación del conjunto de biomarcadores, tal como se describe en el presente documento, con el recuento de células CD4, preferiblemente la proporción de células CD4/CD8.

[0079] Con este conocimiento, se puede ajustar con precisión y adaptar la terapia del paciente, tal como adaptando la dosis de administración de un agente activo, o administrando agentes activos alternativos, basándose en el conocimiento recibido a partir de la medición de los biomarcadores (conjunto de), tal como se describe en el presente documento. Dicho hecho no se ha logrado nunca antes.

Kit

[0080] Además, también se describe un kit adaptado para llevar a cabo el procedimiento, en el que el kit comprende un dispositivo, cuyo dispositivo contiene uno o más pocillos y uno o más insertos impregnados con al menos un patrón interno. Dicho dispositivo se describe con detalle en los documentos WO 2007/003344 y WO 2007/003343.

[0081] Los siguientes ejemplos califican mejor la presente invención sin pretender limitar el alcance de ninguna forma.

Ejemplos

Información general

25

Pacientes y procedimientos

[0082] Se analizaron 37 muestras aleatorias de pacientes infectados por el VIH prospectivas con seguimiento en la Cohorte del centro de investigación del Sida de Sao Paulo (SPARCC). Esta última es una cohorte reciente de pacientes infectados por el VIH cuyo objetivo es estudiar la historia natural del VIH y su progresión al SIDA y está bien descrito en otra parte (Kallas BJID 2004).

[0083] Los datos demográficos de SPARCC, carga viral de VIH-1 y recuento de células CD4+ se recogieron cada tres meses durante las consultas clínicas. Las muestras se analizaron al inicio y un año después de seguimiento. Para los pacientes sin respuesta inmunológica y los pacientes con respuesta inmunológica, las muestras iniciales se recogieron inmediatamente antes del tratamiento con recuentos de células CD4+ <350 células/mm³ y las muestras de un año se recogieron exactamente a los 12 meses en la consulta de tratamiento.

[0084] Los controles incluían 11 individuos sanos no infectados por el VIH que se correspondían en edad y sexo, y debido a que también se pueden observar cambios metabólicos similares inducidos por infecciones víricas en células de cáncer (Yu et al. 2011) se incluyeron 64 pacientes de cáncer de mama en fase III no infectados por el VIH sin tratamiento previo, en el grupo de control. Identificación de pacientes con VIH incluso en presencia de factores de confusión metabólicos representados por pacientes con cáncer de mama en fase avanzada (fase 3). Los controles de cáncer de mama se usaron debido al hecho de que también se pueden observar cambios metabólicos similares inducidos por infecciones víricas en células de cáncer (glutaminólisis, biosíntesis de lípidos de éter = suma de plasmalógeno araquidónico/plasmalógeno de fosfatidilcolinas). Si embargo, en los pacientes con VIH, no se observó la biosíntesis de lípidos aumentada para esfingomielinas (SM); pero estaba muy regulada por disminución.

50 **Medición de metabolitos**

[0085] El perfil de metabolitos objetivo, por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) por ionización por electropulverización (ESI), se llevó a cabo en 37 muestras de plasma recogidas al inicio y en 1 año de seguimiento, de pacientes distribuidos como: 5 pacientes sin respuesta inmunológica, 5 pacientes con respuesta inmunológica, 5 pacientes de progresión rápida y 5 pacientes élite, así como 75 controles, de forma independiente, por servicio prestado, en una plataforma de metabolómica cuantitativa en Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria.

[0086] Todos los datos de metabolómica se usaron como se recibieron de Biocrates. La técnica de mediciones metabolómicas experimentales se describe con detalle en la patente US 2007/0004044.

60

[0087] La cuantificación de los metabolitos de la muestra biológica se logra con respecto a los patrones internos adecuados y el procedimiento se ha probado que está en conformidad con 21CFR (Código de regulaciones federales) Parte 11, que implica prueba de reproducibilidad dentro de un intervalo de error dado. Las concentraciones de todos los metabolitos analizados se dan en µM y los resultados se compararon con tasas de respuesta tumoral y subtipos intrínsecos de tumor.

65

Panel de metabolitos

[0088] El panel de metabolitos está compuesto por 183 metabolitos diferentes de los cuales 40 son acilcarnitinas, 19 aminoácidos proteínogénicos, ornitina y citrulina, 19 aminas biogénicas, suma de hexosas, 76 fosfatidilcolinas, 14 liso-fosfatidilcolinas y 15 esfingomielinas, como se muestra en las tablas 1-5 anteriores.

[0089] Los glicerofosfolípidos se diferencian además con respecto a la presencia de enlaces éster (a) y éter (a) en el resto glicerol, donde dos letras (aa=diacilo, ae=acilo-alquilo, ee=dialquilo) indica que dos posiciones del glicerol están unidas a un resto de ácido graso, mientras que una sola letra (a=acilo o e=alquilo) indica la presencia de un solo resto de ácido graso.

[0090] La composición de la cadena lateral lipídica se abrevia como Cx:y, donde x indica el número de carbonos de la cadena lateral e y indica el número de dobles enlaces. P. ej., "PC ae C38:1" indica un plasmalógeno/ fosfatidilcolina plasminógeno con 33 carbonos en las dos cadenas de ácidos grasos y un solo doble enlace en una de ellas.

Estadística y análisis de datos

[0091] Los casos de entrenamiento se usaron para el descubrimiento de marcadores y para identificar cualquier variable clínica que pudiera estar asociada con la respuesta por análisis de regresión logística. La cuantificación de las concentraciones de metabolitos y la evaluación del control de calidad se llevó a cabo con el paquete de programas MetIQ (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). Los patrones internos sirven como la referencia para los cálculos de concentración de metabolitos. Después se exportó un fichero xls, que contenía nombres de muestras, nombres de metabolitos y concentración de metabolitos con la unidad de $\mu\text{mol/l}$ de plasma.

[0092] Después los datos se subieron a la herramienta analítica basada en la web MetaboAnalyst 2.0 (www.metaboanalyst.ca) y se normalizaron usando protocolos de normalización de MetaboAnalyst (56) para análisis uni y multivariante, selección de características de alta dimensión, agrupación y clasificación supervisada, enriquecimiento funcional, así como análisis de la ruta metabólica.

[0093] Los datos también se importaron a ROC CET (ROC Curve Explorer & Tester) disponible en <http://www.roccet.ca/ROC CET/> para la generación de las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) uni y multivariantes obtenidas mediante máquina de vectores de soporte (SVM), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y bosques aleatorios. Las curvas se generaron mediante validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV) usando submuestreos equilibradas donde dos tercios (2/3) de las muestras se usaron para evaluar la importancia de las características.

[0094] Después, las características significativas se usaron para construir modelos de clasificación, que se validaron en 1/3 de las muestras que se dejaron aparte. Se repitió el mismo procedimiento múltiples veces para calcular el rendimiento e intervalo de confianza de cada modelo.

Definiciones de los términos:

[0095]
(1) Regulación por aumento y por disminución: Una regulación por aumento significa un aumento en la concentración de un metabolito, p. ej., un aumento en la velocidad a la que ocurre esta reacción bioquímica debido, por ejemplo, a un cambio en la actividad enzimática. Para una regulación por disminución es al revés.

(2) Prueba t: La prueba t es una prueba de hipótesis estadística y la usada es una integrada en el software de MarkerView y se aplica a todas las variables en la tabla y determina si la media de cada grupo es significativamente diferente dada la desviación estándar y el número de muestras, p. ej., para descubrir si hay una diferencia real entre las medias (promedios) de dos grupos diferentes.

(3) valor p: El valor p es la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el observado realmente, suponiendo que la hipótesis nula (la hipótesis de no cambio o efecto) es verdadera. El valor p siempre es positivo y cuanto más pequeño es el valor menor es la probabilidad de que se produzca un cambio. Un valor p de 0,05 o menos rechaza la hipótesis nula al nivel de 5%, lo que significa que solo el 5% del tiempo el cambio es una posibilidad. Este es el nivel expuesto en las tablas.

(4) Cambio de factor log (*Log-fold change*): El cambio de factor log se define como la diferencia entre las concentraciones transformadas por log medias en cada afección. Esta es una forma de describir cuánto de mayor o menor es el valor en un grupo comparado con otro. Por ejemplo, un cambio de factor log de 0,3 es "equivalente" a un cambio de factor $\exp(-0,3)=0,74=(1/1,34)$ de aumento comparado con el control o cambio de factor 1,34 de disminución de la enfermedad.

Resultados:**Diferenciación entre individuos infectados por VIH, cáncer de mama y controles sanos (realización de referencia)**

5

[0096] Primero se llevó a cabo un análisis de PLS-DA que mostraba la clara discriminación entre pacientes con VIH (n=37) en fases aguda y crónica, con o sin carga viral detectable comparado con 75 controles después de 100 pasos de permutación. Es importante que el perfil discriminativo identificado era suficientemente robusto para identificar los pacientes con VIH incluso en presencia de factores de confusión metabólicos representados por 64

10 pacientes de cáncer de mama en fase avanzada (figura 1). Un análisis de mapa de calor generado a partir de este análisis también demuestra una discriminación perfecta entre estos tres subgrupos descritos antes.

[0097] Además, se llevó a cabo un análisis de curvas ROC (figura 3) para demostrar una vez más las enormes capacidades discriminativas del ensayo aplicado incluso después de 1000 permutaciones (valor p empírico: 15 $p < 0,001$). El análisis estadístico adicional representado en la figura 4 demuestra que después de 2000 pasos de permutación la precisión de la predicción del ensayo de los autores de la invención permanecía altamente significativa ($p < 5e-04$).

Análisis descriptivo de los metabolitos de la sangre

20

[0098] En tercer lugar, se llevó a cabo un análisis descriptivo de los 25 metabolitos en la sangre superiores más correlacionados con la enfermedad por el VIH usando un análisis del r de Pearson (tabla 6 y figura 2). Como se muestra, se observaron niveles muy bajos de esfingomielinas y dopamina. Este hallazgo también se puede observar en la figura 4 donde se llevó a cabo un análisis de la prueba t basado en las concentraciones de metabolitos en la 25 sangre de pacientes con VIH y controles. La esfingomielina C24:1 está casi 100 veces menos concentrada en los pacientes con VIH cuando se compara con los controles; expresado en el gráfico de cajas y bigotes de la figura 4A.

[0099] Por otra parte, se observaron niveles altos de acilcarnitinas C5-M-DC y C5:1-DC al mismo tiempo que C12 y C8:1 eran regulados por disminución (fig. 4B). Se podría concluir de la importante desregulación del 30 metabolismo de acilcarnitinas y esfingomielinas que la infección por el VIH es seguida por deficiencias funcionales en la beta oxidación mitocondrial, así como en la biosíntesis de esfingolípidos.

[00100] Con el fin de confirmar esta conclusión, se agruparon las proporciones de determinadas concentraciones de metabolitos como una variable sustitutiva para la actividad enzimática relacionada primero, con la etapa inicial y de ejecución de la beta oxidación catalizada por acilo-CoA deshidrogenasas de cadena corta, media 35 y larga (ACADS, ACADM y ACADL, respectivamente) y segundo, con el locus de SYNE2 debido a su proporción con la actividad de la SGPP1 (esfingosina-1-fosfato fosfatasa 1).

[00101] Realmente, experimentos en levaduras mostraron que la esfingosina-1-fosfato estimula la 40 incorporación de palmitato, un sustrato tanto para la serina palmitoiltransferasa como la ceramida sintasa, en 16-ceramida, y que la expresión de la SPP-1 (SGPP1 en levaduras) aumentaba la incorporación de esfingosina en todas las especies de cadenas acilo de ceramida, potenciando en particular ceramidas de cadena larga C16:0, C18:0 y C20:0. Además, se ha mostrado un polimorfismo en SGPP1 que se asocia con diferentes especies de esfingomielina.

45

[00102] Los resultados estadísticos de ANOVA confirmaron que la infección por el VIH comparada con los 50 controles sanos, es seguida primero, por una disminución significativa en la función mitocondrial como se pone de manifiesto por la caída importante de la función de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (ACADM) en los 4 grupos de pacientes al inicio y después de 1 año de seguimiento (Proporción C12/C10, $p=1,3892E-9$, $-\log_{10}(p)=8,8572$, $FDR=1,9757E-8$) (fig. 5A).

[00103] Es de destacar que cuando se lleva a cabo el análisis de correlación con la proporción C12/C10 entre los pacientes con VIH y los controles, casi todos los metabolitos desregulados inducidos por la infección por el VIH (fig. 4A y 4B) son redirigidos adecuadamente hacia la normalidad (fig. 5B). Y segundo, por una disminución 55 significativa de la síntesis nueva de esfingomielinas debido al locus SYNE2 disminuido, en particular en el grupo sin respuesta inmunológica después de 1 año de seguimiento, evaluado por la proporción de PC aa C28:1/PC ae C40:2 ($p=8-4667E-7$, $-\log_{10}(p)=6-0723$, $FDR=1-2712E-5$) (fig. 6A y B).

[00104] Cuando se compara el grupo sin respuesta inmunológica con su homólogo, se podía mostrar un 60 aumento significativo en la síntesis de lípidos de éter en el primer grupo. Se concluyó que la enzima metabólica alquilgliceronafofosfato sintasa (AGPS), una etapa crítica en la síntesis de lípidos de éter, podía ser activada en el grupo sin respuesta inmunológica. Con el fin de ensayar esta conclusión, la proporción de PC ae total a PC total se agrupó como una variable sustitutiva para evaluar la actividad de la AGPS. Los resultados confirmaron claramente la conclusión (fig. 7) y lo que es más importante, pusieron de manifiesto que en el grupo de pacientes con respuesta 65 inmunológica la actividad enzimática de la AGPS volvía a niveles normales después de 1 año de seguimiento. Por otra parte, en el grupo de pacientes sin respuesta inmunológica la actividad enzimática no volvía a niveles normales

(fig. 7).

[00105] Además, se pudo observar sorprendentemente en la presente invención que se puede lograr una mejora en la precisión del cribado/diagnóstico de pacientes mediante la detección simultánea de una combinación de al menos una acilcarnitina y al menos una esfingomielina en comparación con compuestos individuales, es decir, la acilcarnitina sola o la esfingomielina sola, en un único análisis, tal como se demuestra en la tabla 11 a continuación.

10 Tabla 11: Evaluación de la acción de diferentes combinaciones de acilcarnitinas y esfingomielinas frente a los compuestos individuales mediante análisis ROC

Metabolito	AUC
C3/SM C24:0	0,92
C0/SM C24:0	0,96
C0/SM C20:2	0,95
C4/SM C20:2	0,71
C3	0,80
C0	0,91
C4	0,60
SM C24:0	0,88
SMC20:2	0,68

Biofirma de metabolitos plasmáticos de la progresión de la enfermedad por el VIH

15 **[00106]** Después del análisis de ROC exploratorio univariante y multivariante en el conjunto de validación (n=20 donde 8 se clasificaron como pronóstico bueno y 12 se clasificaron como pronóstico malo, se llevaron a cabo 100 pasos de permutación), se podía identificar una firma de metabolitos en la sangre entre los pacientes sin respuesta inmunológica y/o entre los pacientes de progresión rápida, con una sensibilidad de 88,89%, una especificidad de 92,31%, un valor predictivo positivo de 88,89% y un valor predictivo negativo de 92,31% [AUC= 20 0,871 (IC al 95%: 0,619-1), valor p empírico = 0,01] como se muestra en la figura 8. El análisis de PLS-DA y PCA representado en la figura 9 también demuestra diferencias en las concentraciones de metabolitos entre los controles, pronósticos buenos y pronósticos malos.

[00107] Cinco metabolitos (tabla 11) proporcionaron esta biofirma metabolómica del plasma de la progresión de la enfermedad por el VIH: AC-DC/C3-OH total (AUC 0,84706; valor p de 8,5342E-5), Tyr/Phe/PC ae C38:4 (AUC 25 0,83824; valor p 4,6799E-4), Tyr/Phe/PC ae C40:6 (AUC 0,83235; valor p 4,3552E-4), C3-OH/C14:2-OH (AUC 0,82059; valor p de 4,6198E-4) y Tyr/Phe/Sum Arac PC ae (AUC 0,81765; valor p 4,558E-4).

30 Tabla 12: Metabolitos usados en el análisis multivariante para predecir el pronóstico peor en pacientes con VIH

Metabolitos	AUC	valor p
AC-DC/C3-OH Total	0,84706	8,5342E-5
Tyr/Phe/PC ae C38:4	0,83824	4,6799E-4
Tyr/Phe/PC ae C40:6	0,83235	4,3552E-4
C3-OH/C14:2-OH	0,82059	4,6198E-4
Tyr/Phe/Sum Arac PC ae	0,81765	4,558E-4

[00108] Además, la acción de las diferentes combinaciones de al menos una PC ae con al menos dos aminoácidos se ha evaluado comparando los sujetos con respuesta frente a otros y comparado con la acción de los metabolitos individuales, es decir, solo la PC ae o solo los dos aminoácidos. Los resultados se muestran en la tabla 35 13 a continuación.

Tabla 13: Evaluación de la acción de las diferentes combinaciones de PC ae y los dos aminoácidos frente a los compuestos individuales mediante análisis ROC

Metabolito	AUC
PC ae C40:6/Phe/Tyr	0,91
PC ae C40:6/Tyr/Trp	0,92
PC ae C40:6/Met/Asn	0,80
PC ae C40:6/AA aromático	0,76
Tyr	0,73
Trp	0,54
Ile	0,52
Met/Asn	0,78

Phe/Tyr	0,79
His/Tyr/Phe/Trp	0,58
PC ae C40:6	0,74

[00109] Sorprendentemente, se podría observar que la combinación de los tres metabolitos actúa de forma significativamente mejor que la proporción de aminoácidos de dos aminoácidos solos o la PC ae sola.

5 Metabolitos plasmáticos para el control de la actividad de la enfermedad de VIH (realización de referencia)

[00110] Tal como se muestra en la figura 10A, la combinación de PUFA PC ae/MUFA PC ae muestra una clara correlación con el recuento de células CD4/CD8 como marcador de diagnóstico para el control de la actividad del VIH. La selección de un subgrupo de lípidos (PC ae) aumenta claramente por tanto esta correlación en comparación con una combinación que utiliza todos los lípidos, tal como se muestra en la figura 10B (PUFA/MUFA). Además, la combinación de PUFA/MUFA (figura 11B) no muestra una correlación con CD4/CD8, mientras que la selección de PC ae también mejora la correlación (figura 11A).

[00111] Por lo tanto, sorprendentemente, se podría observar en la presente divulgación que una combinación de metabolitos que comprende la proporción de la cantidad total de lípidos de éter poliinsaturado araquidónico (PUFA ae) con la cantidad total de lípidos de éter de ácido graso monoinsaturado (MUFA ae) y la proporción de la cantidad total de lípidos de éter de ácido graso monoinsaturado (MUFA ae) con la cantidad total de ácidos grasos saturados (SFA) se correlacionan con el recuento de células CD4/CD8 y, de este modo, esta combinación de metabolitos se puede utilizar como un conjunto de biomarcadores para el control de la actividad de la enfermedad del VIH en un sujeto mamífero.

[00112] Los hallazgos de la presente divulgación condujeron a la conclusión de que aparte de la predicción del desenlace del VIH, el perfil de metabolitos de estos pacientes es tan peculiar y específico que permite la identificación de un nuevo procedimiento de diagnóstico basado en la metabolómica de la sangre.

[00113] Por lo tanto, con los biomarcadores identificados en la presente divulgación en solo una muestra de sangre, es posible tener una evaluación del diagnóstico, así como una predicción del desenlace de la enfermedad por VIH. La firma fue validada en muestras con o sin cargas virales detectables, así como en las fases aguda y crónica de la enfermedad.

Aplicabilidad industrial

[00114] La presente invención permite una predicción más fiable de la progresión de la enfermedad. Más en particular, los procedimientos de la presente invención proporcionan nuevos biomarcadores de diagnóstico (no reivindicados) y predictivos capaces de identificar pacientes con mayor riesgo de desarrollar un restablecimiento incompleto del sistema inmunitario después del tratamiento antirretroviral, así como de pacientes de progresión rápida. De hecho, los biomarcadores de acuerdo con la presente invención son fácilmente detectables en muestras biológicas, en particular en la sangre.

[00115] Basándose en esto, se puede preparar un kit que sea adecuado para ser de ayuda en una predicción más fiable de la respuesta terapéutica del paciente a la terapia antirretroviral.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación de metabolitos contenidos en una muestra de sangre, que comprende al menos una fosfatidilcolina que comprende al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae) y al menos los dos aminoácidos tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) como un conjunto de biomarcadores para la predicción de la respuesta inmunológica de un sujeto mamífero a la terapia antirretroviral y/o el pronóstico de la progresión de la enfermedad de VIH.
5
2. Procedimiento para la predicción de una respuesta inmunológica de un sujeto mamífero a terapia antirretroviral y/o pronóstico de la progresión de la enfermedad de VIH, comprendiendo el procedimiento medir en una muestra de sangre obtenida del sujeto la cantidad de al menos una fosfatidilcolina con al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae) y al menos los dos aminoácidos tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe).
10
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la al menos una fosfatidilcolina con al menos un grupo acil-alquilo en la molécula (PC ae) se selecciona entre las incluidas en la tabla 5 de la memoria.
15
4. Procedimiento, según la reivindicación 2 ó 3, que comprende además medir la cantidad de al menos una acilcarnitina.
20
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la al menos una acilcarnitina se selecciona entre las incluidas en la tabla 2 de la memoria.
25
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la medición se basa en un procedimiento analítico cuantitativo seleccionado entre cromatografía, espectroscopía y espectroscopía de masas.
30
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la cromatografía comprende GC, CE, LC, HPLC y UHPLC; la espectroscopía comprende UV/Vis, IR y RMN; y los analizadores/espectrometría de masas comprenden ESI o APCI-QqQ, ESI o APCI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF y MALDI-TOF-TOF.
35
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que los analizadores/espectrometría de masas comprenden analizador de masas de cuadrupolo, analizadores de masas de trampa iónica, analizador de masas de TOF (tiempo de vuelo), analizador de masas Orbitrap, analizador de masas de sector magnético, analizador de masas de sector electrostático, resonancia ciclotrónica de iones (ICR) y combinaciones de analizadores de masas, que incluyen cuadrupolo simple (Q) y triple cuadrupolo (QqQ), QqTOF, TOF-TOF, Q-Orbitrap.

Figura 1

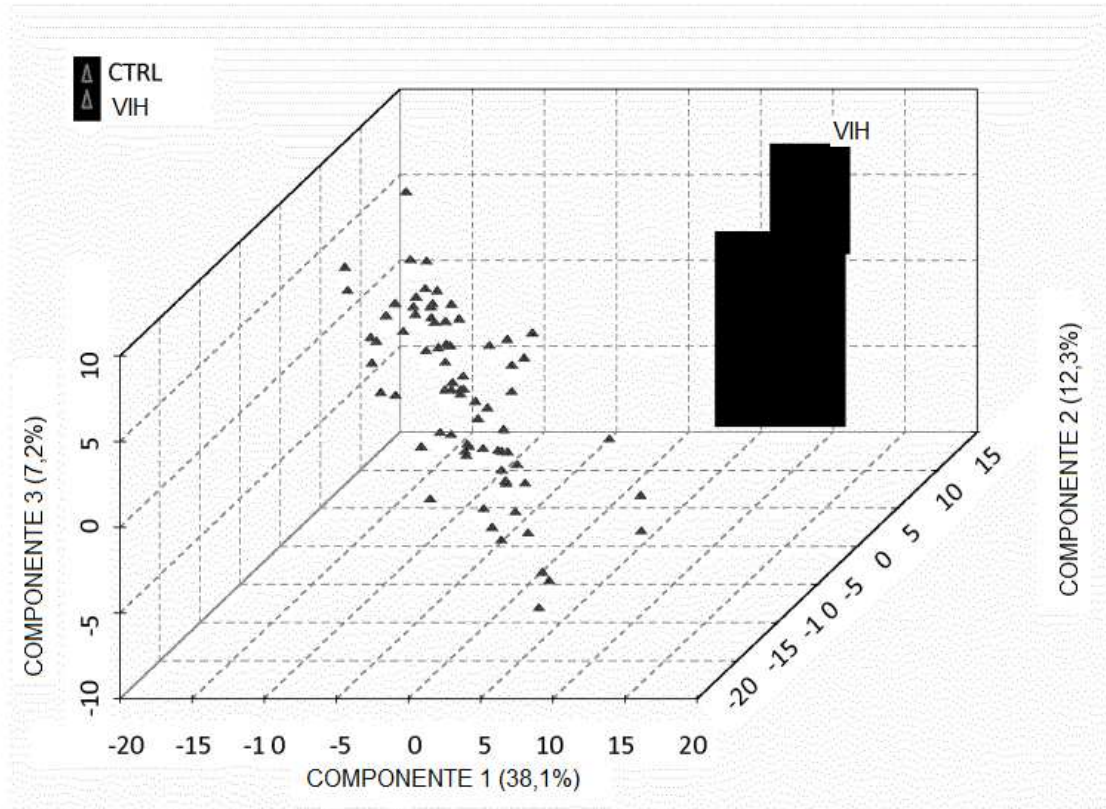


Figura 2A

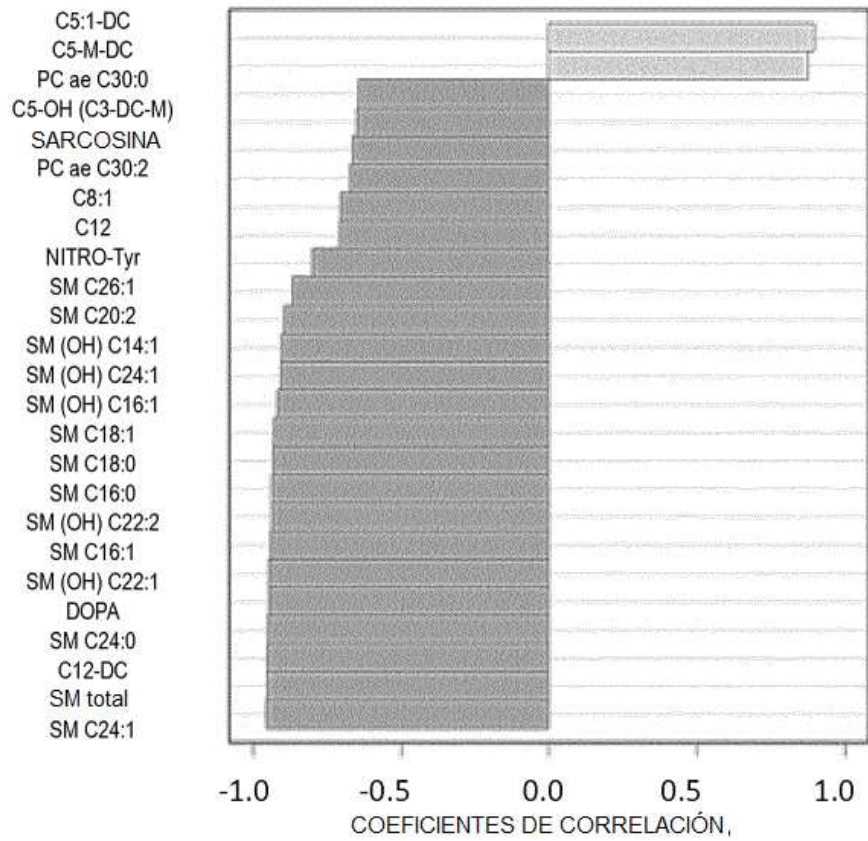


Figura 2 B

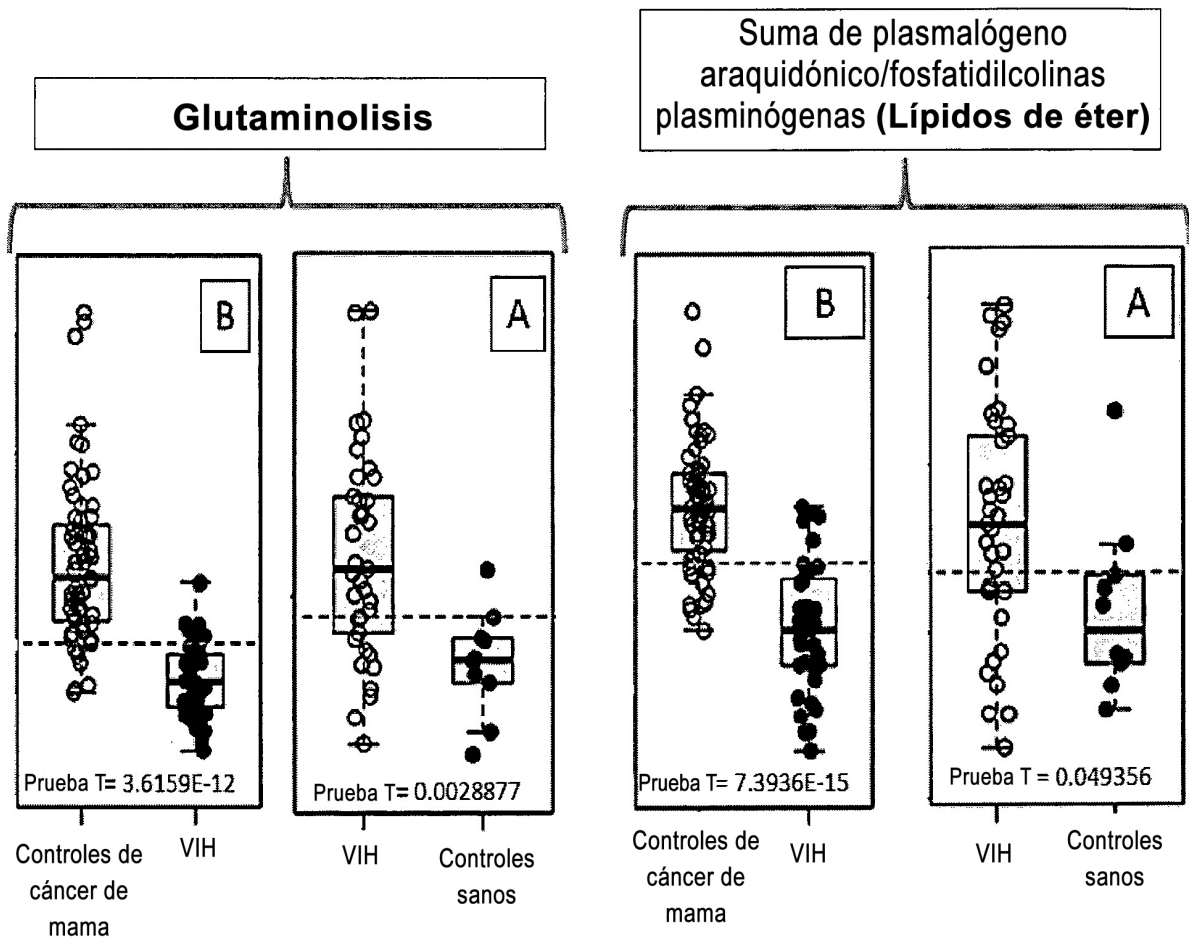


Figura 3.1

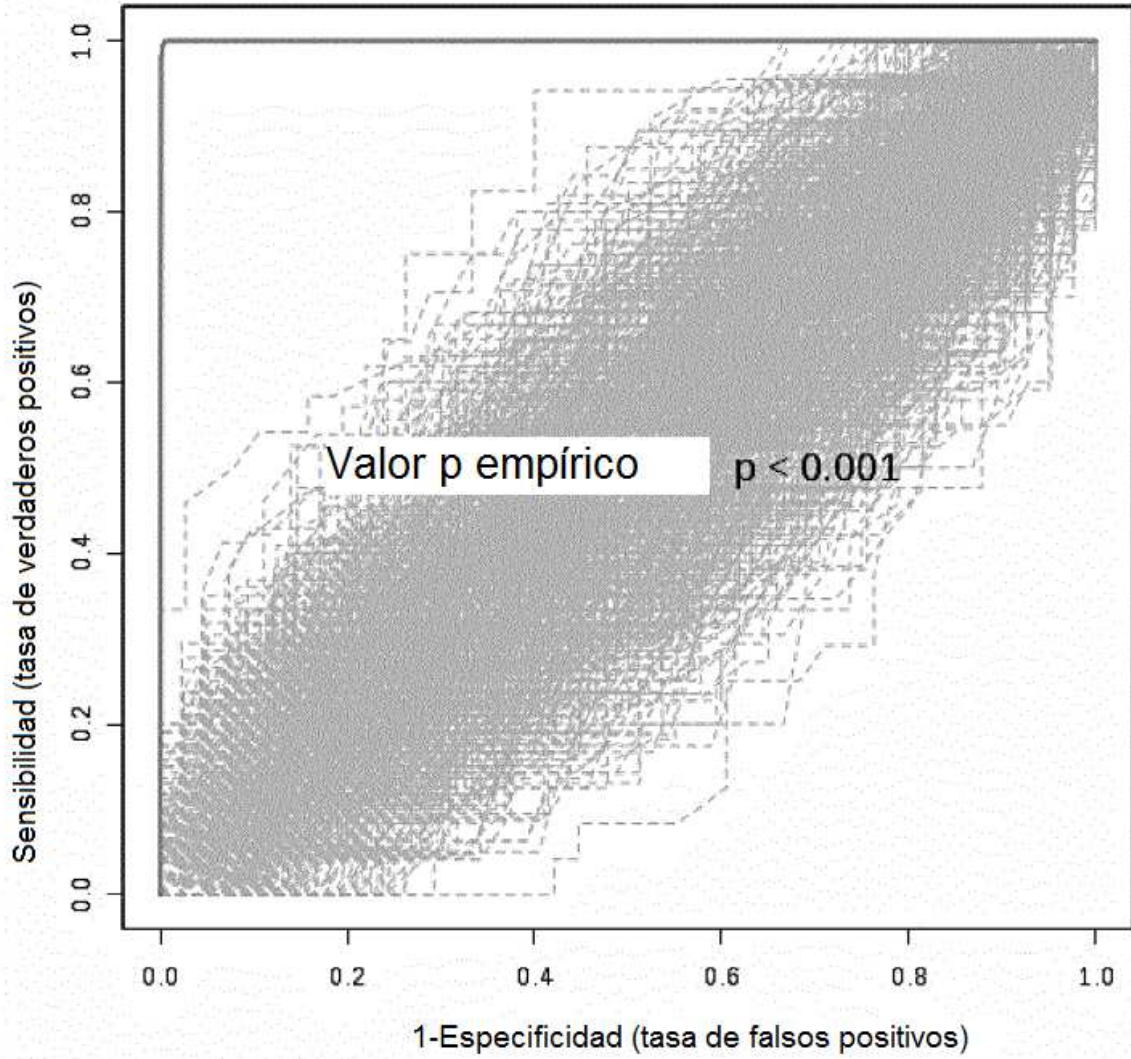


Figura 3.2

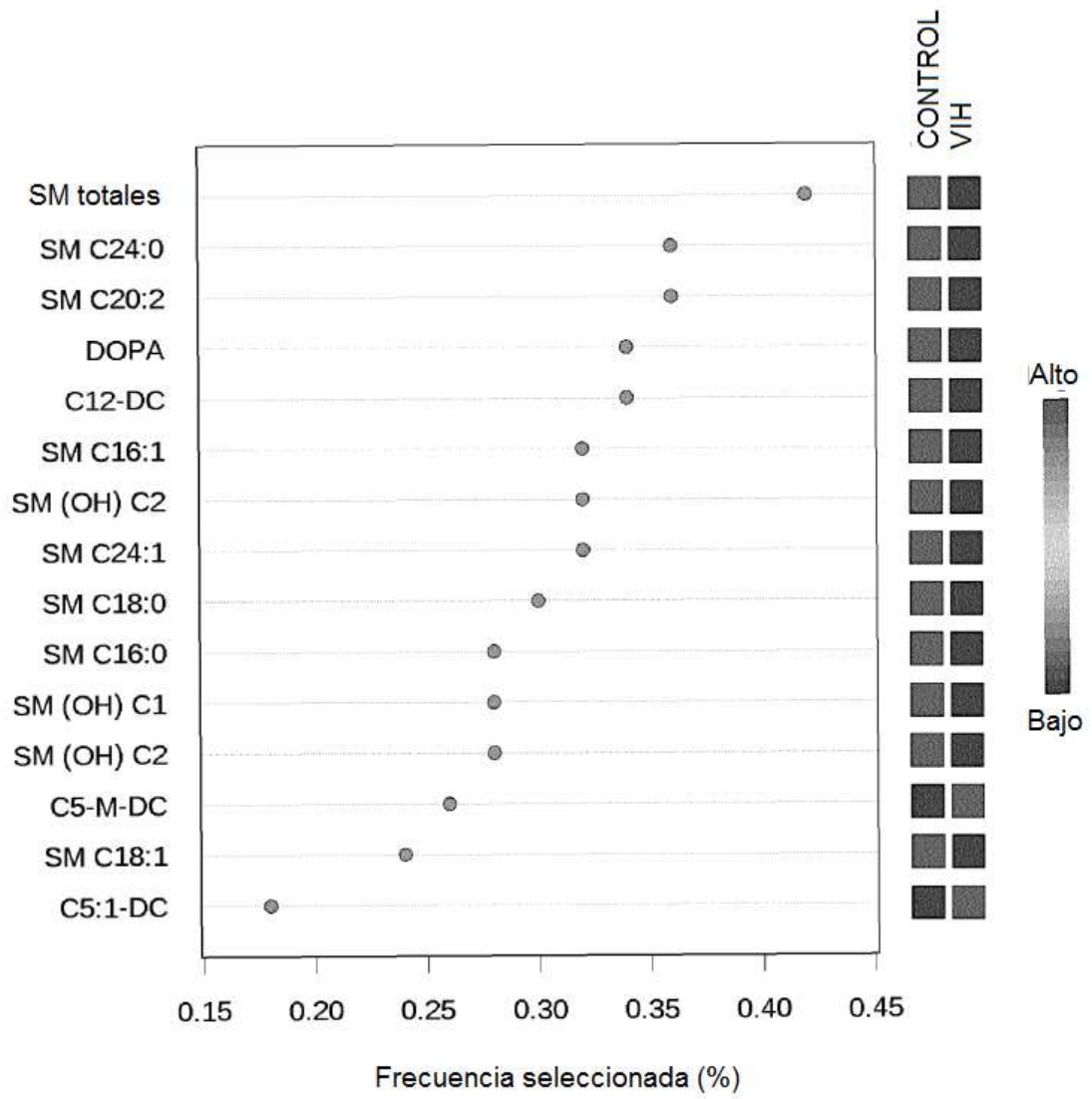


Figura 4A1

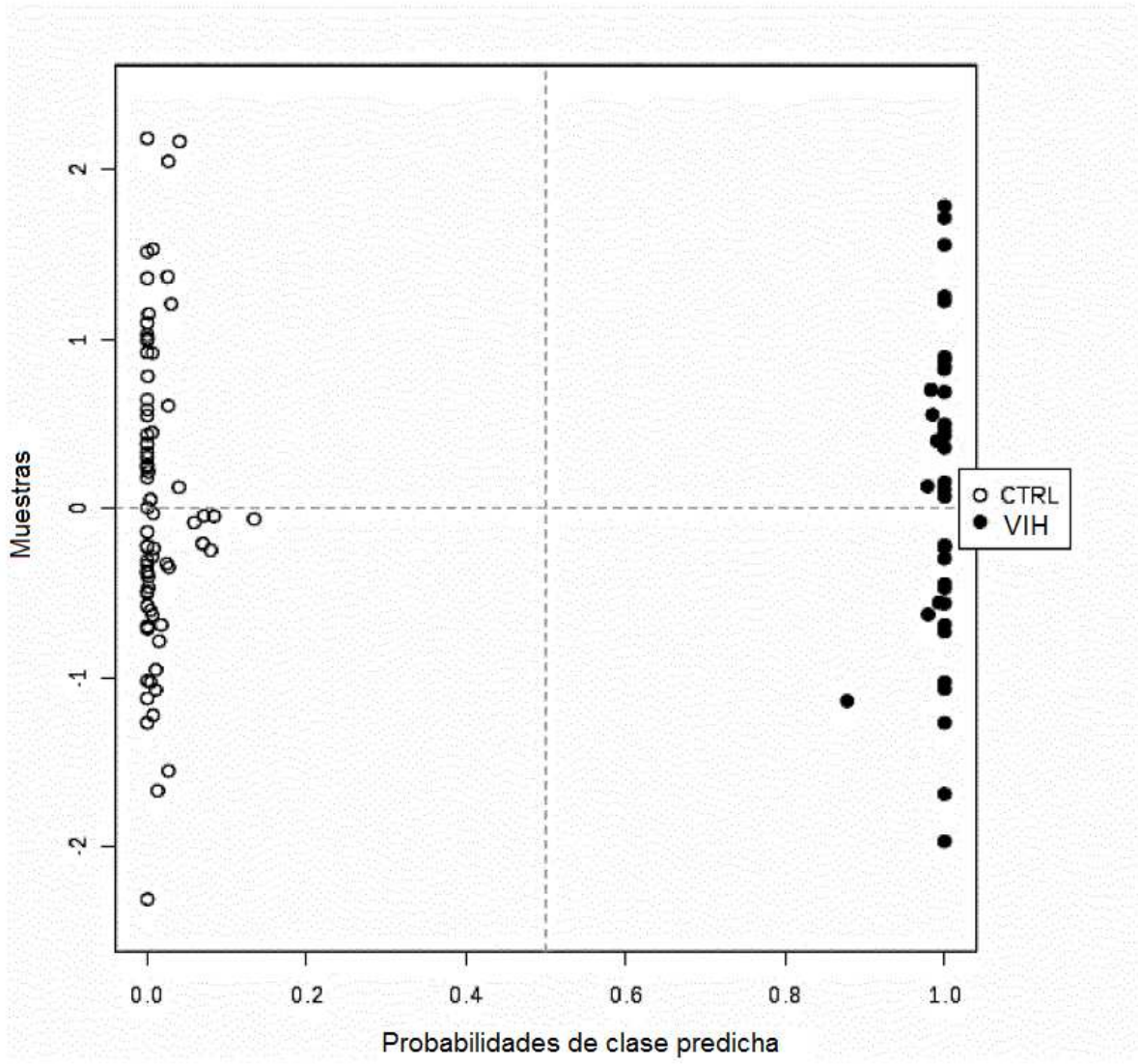


Figura 4A.2

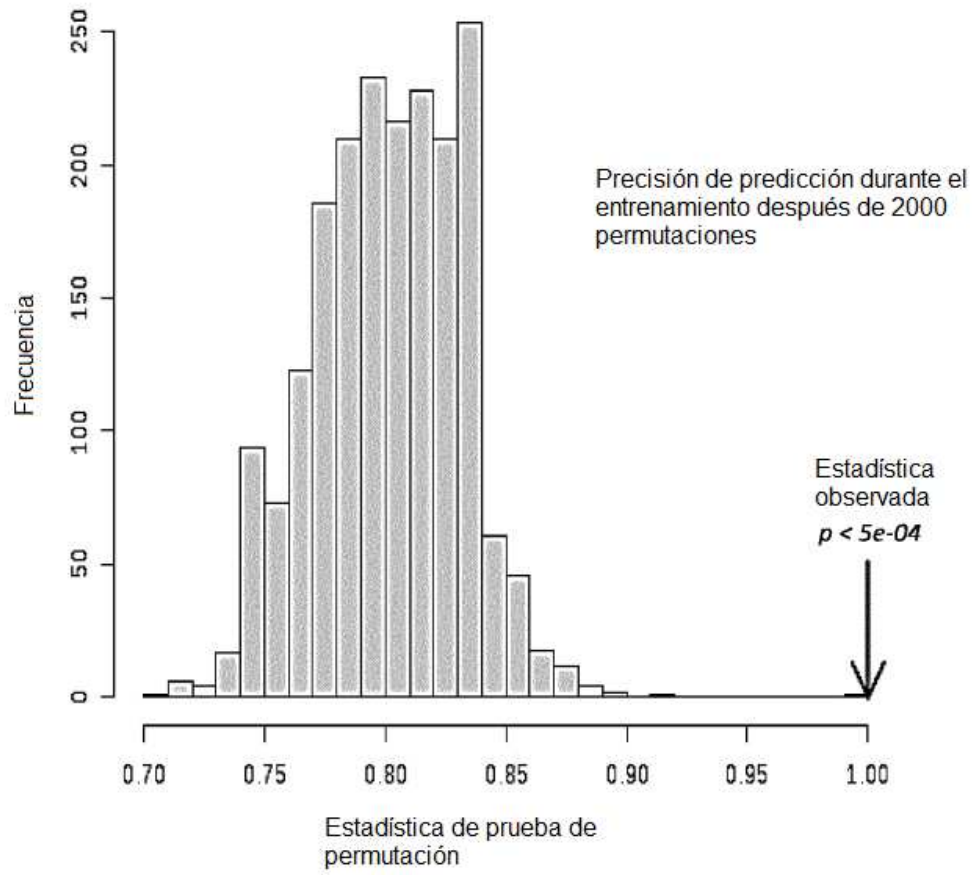


Figura 4B

$p = 2.5393E^{-58}$; $-\log_{10}(p) = 57.595$; $FDR = 4.0227E^{-56}$

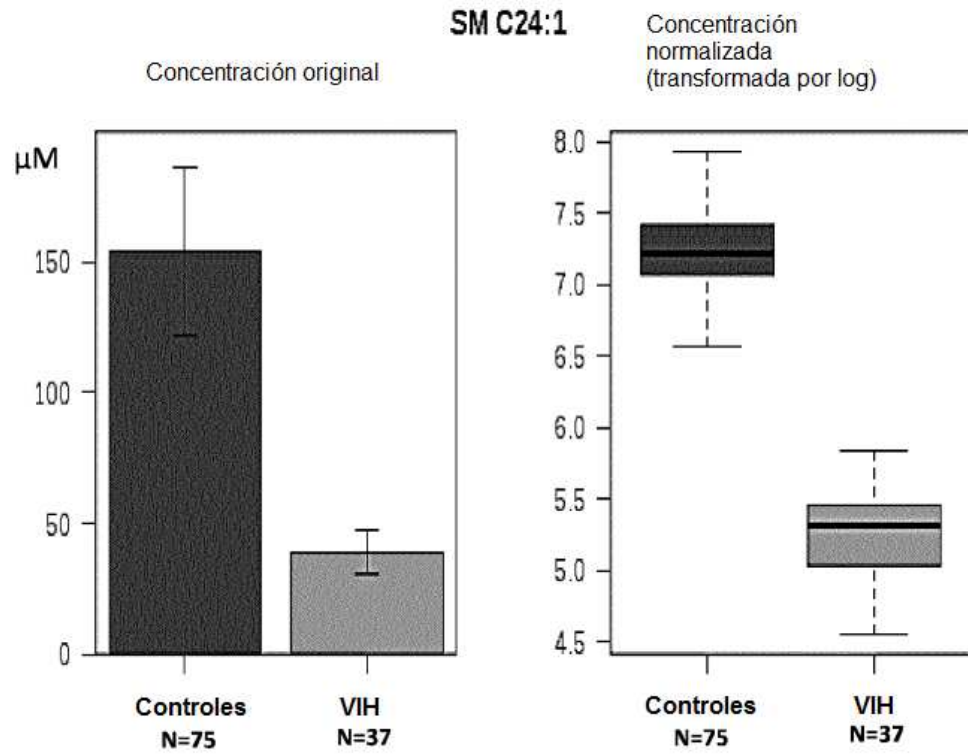


Figura 4C

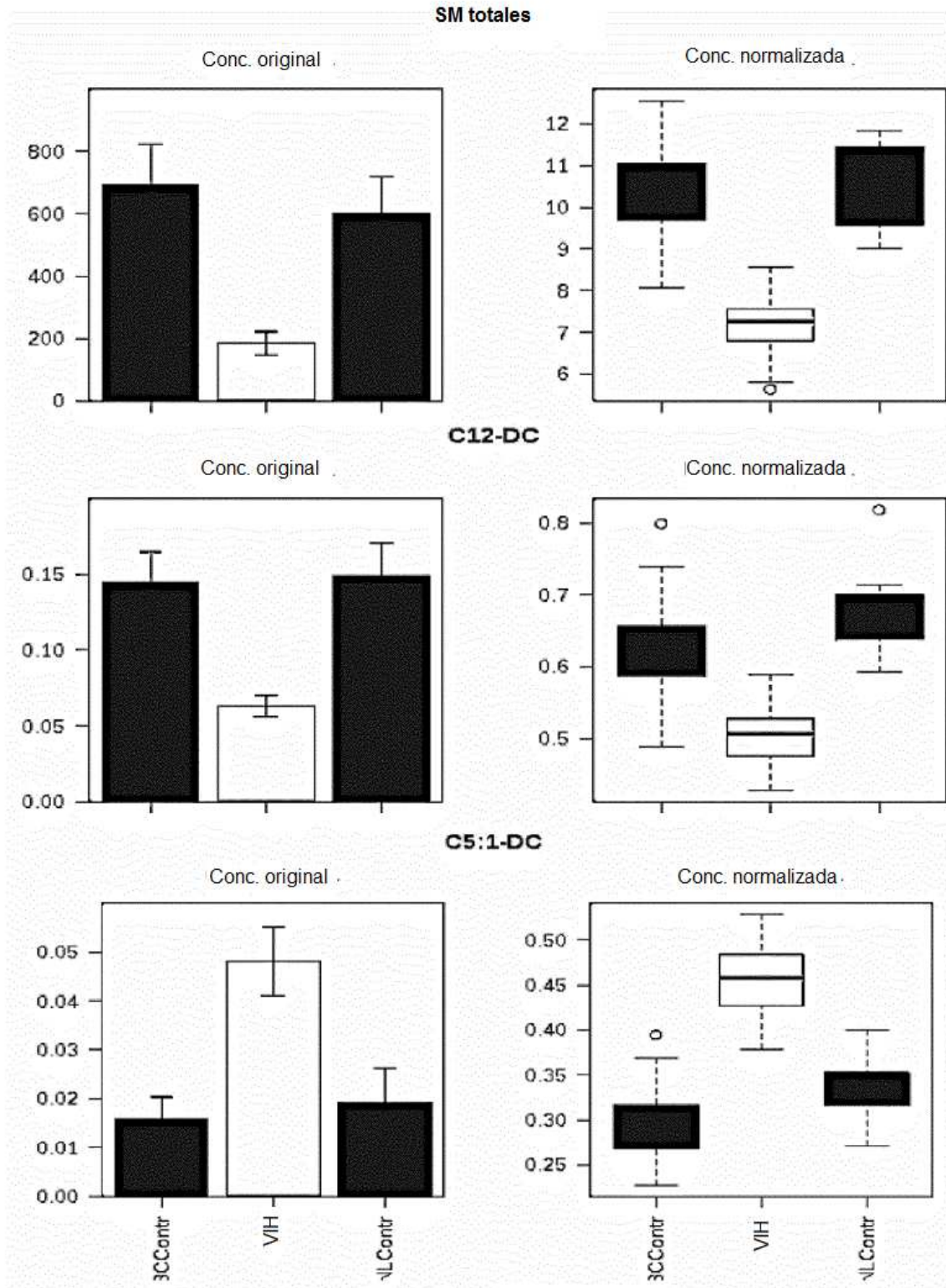


Figura 5A

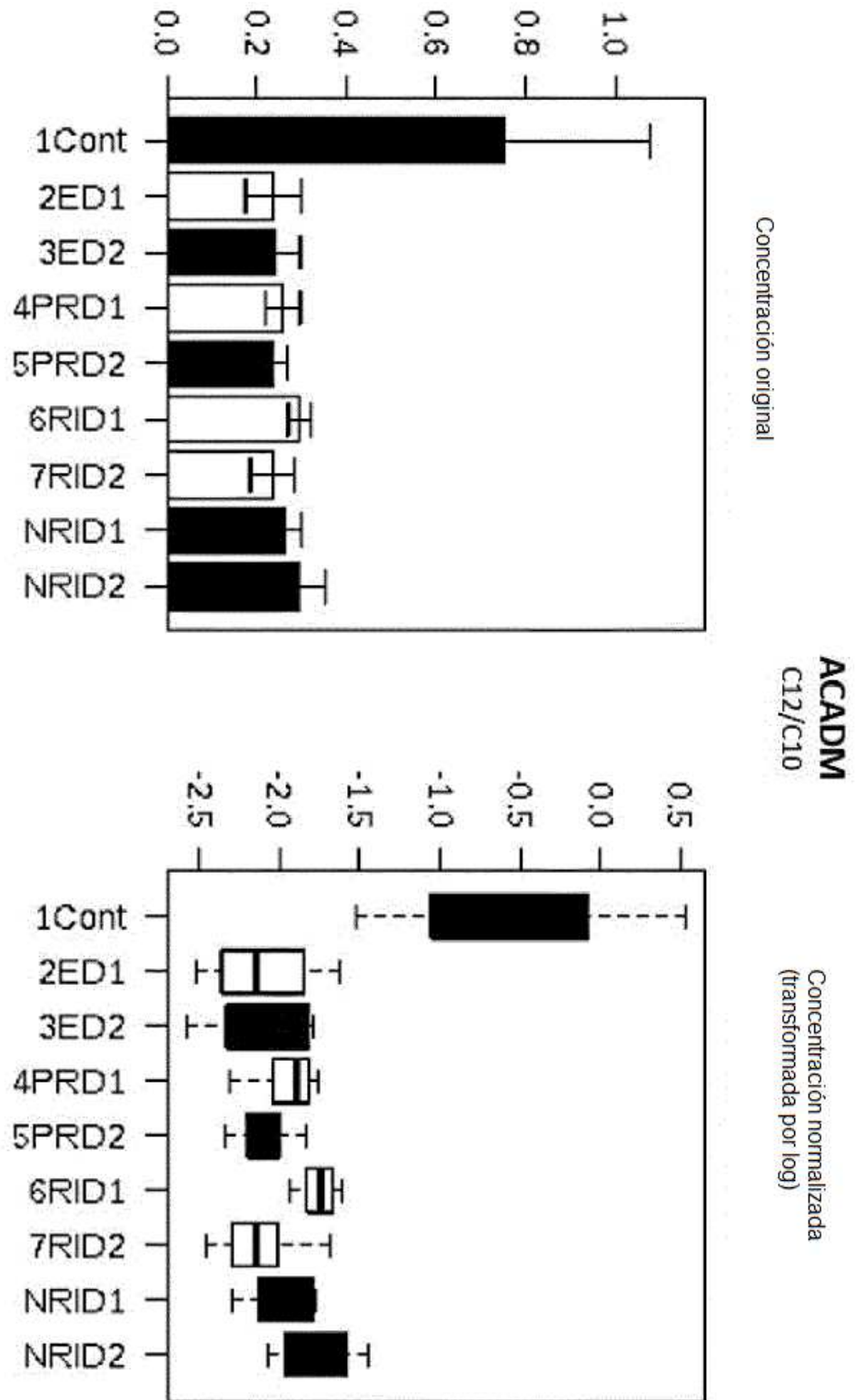


Figura 5B

25 compuestos superiores correlacionados con la C12/C10

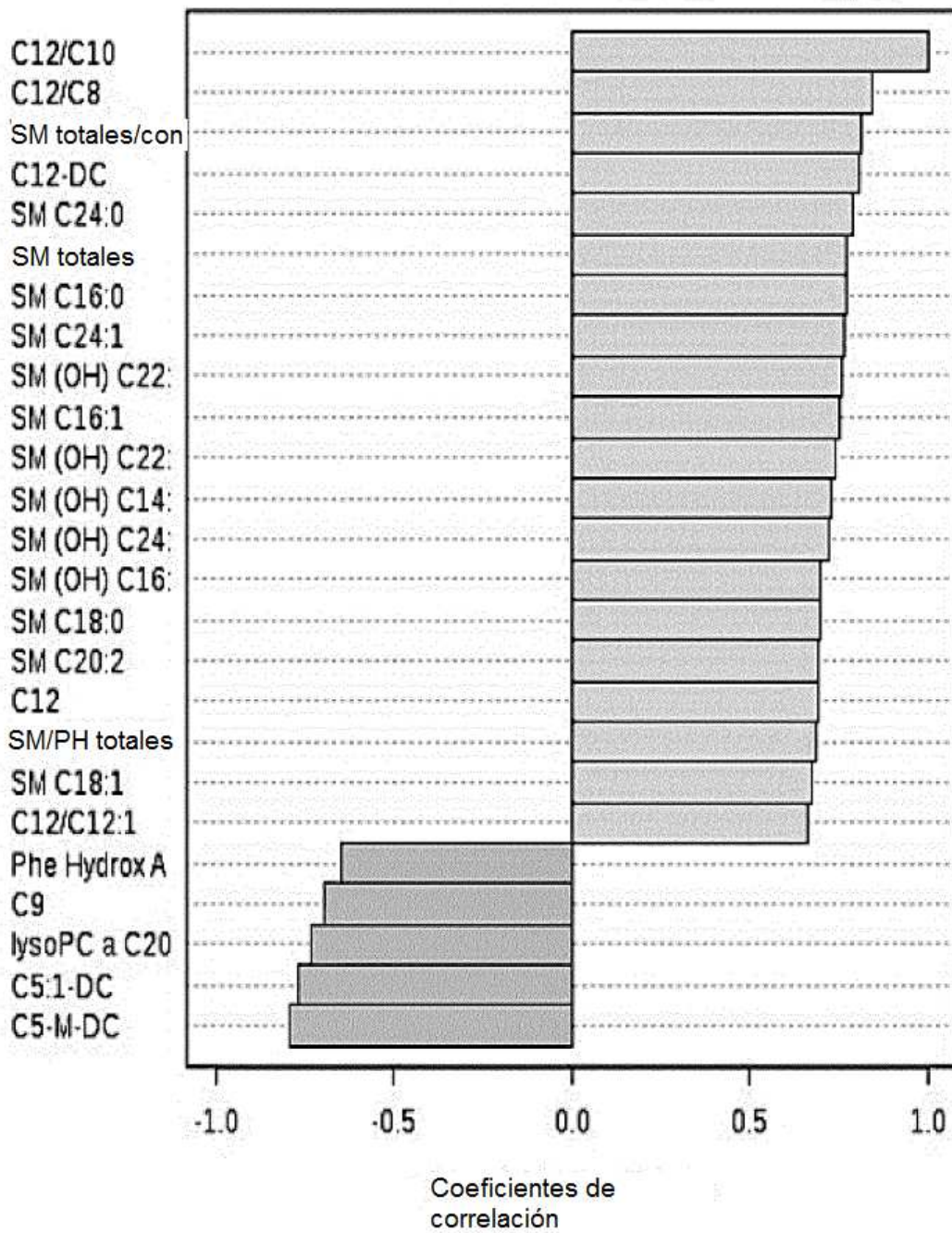


Figura 6A

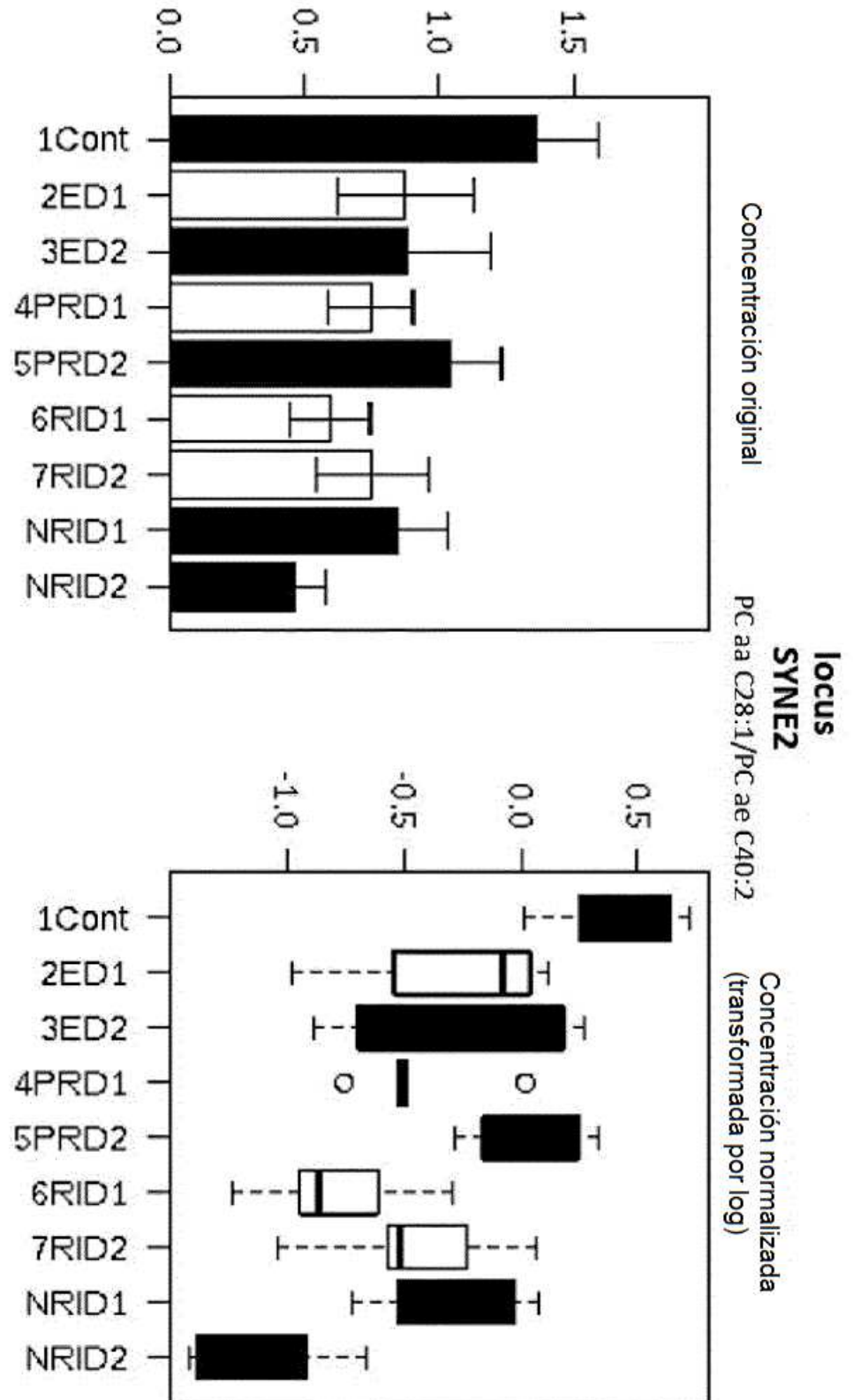


Figura 6B

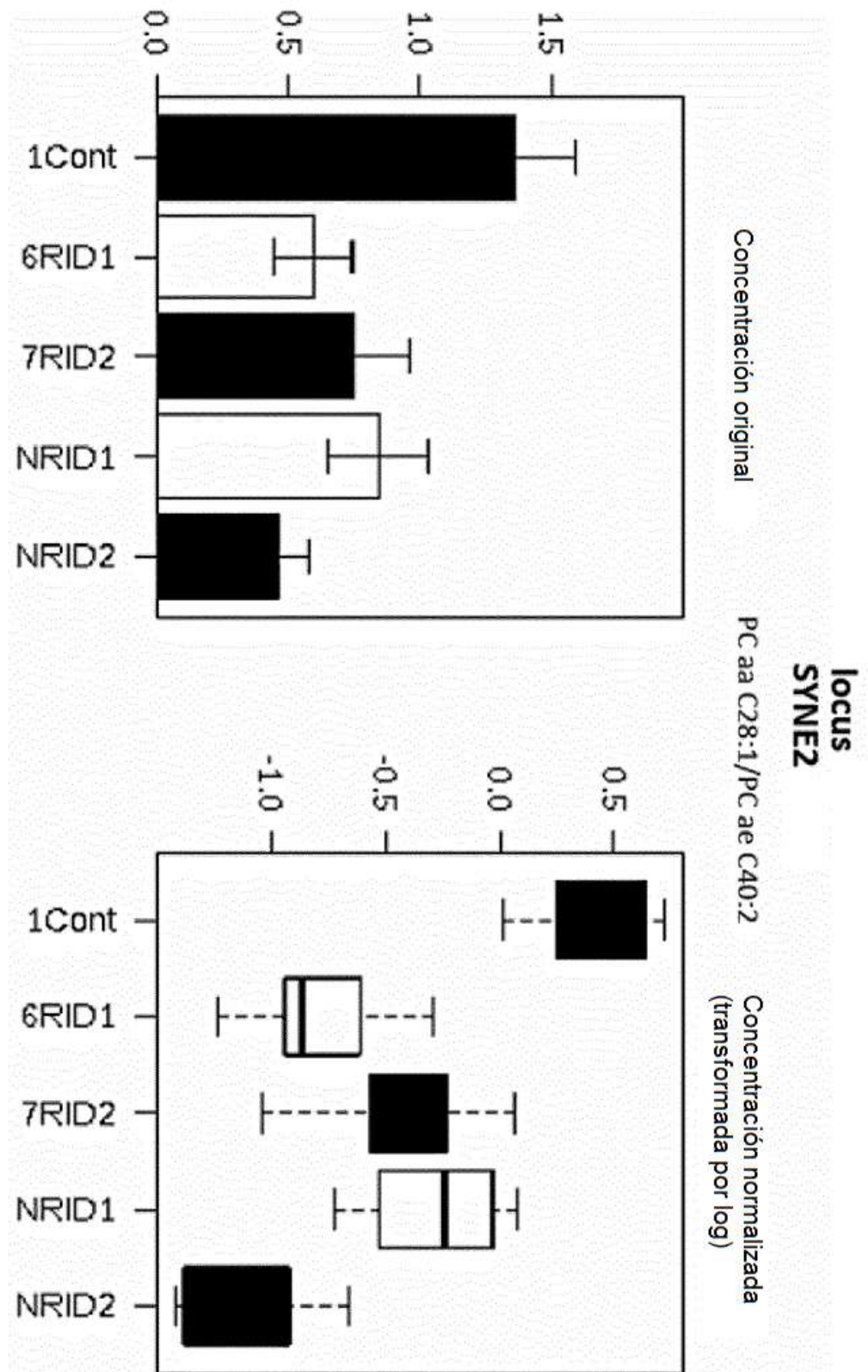


Figura 6C

25 compuestos superiores correlacionados con la PC aa 28:1/PC ae 40:2

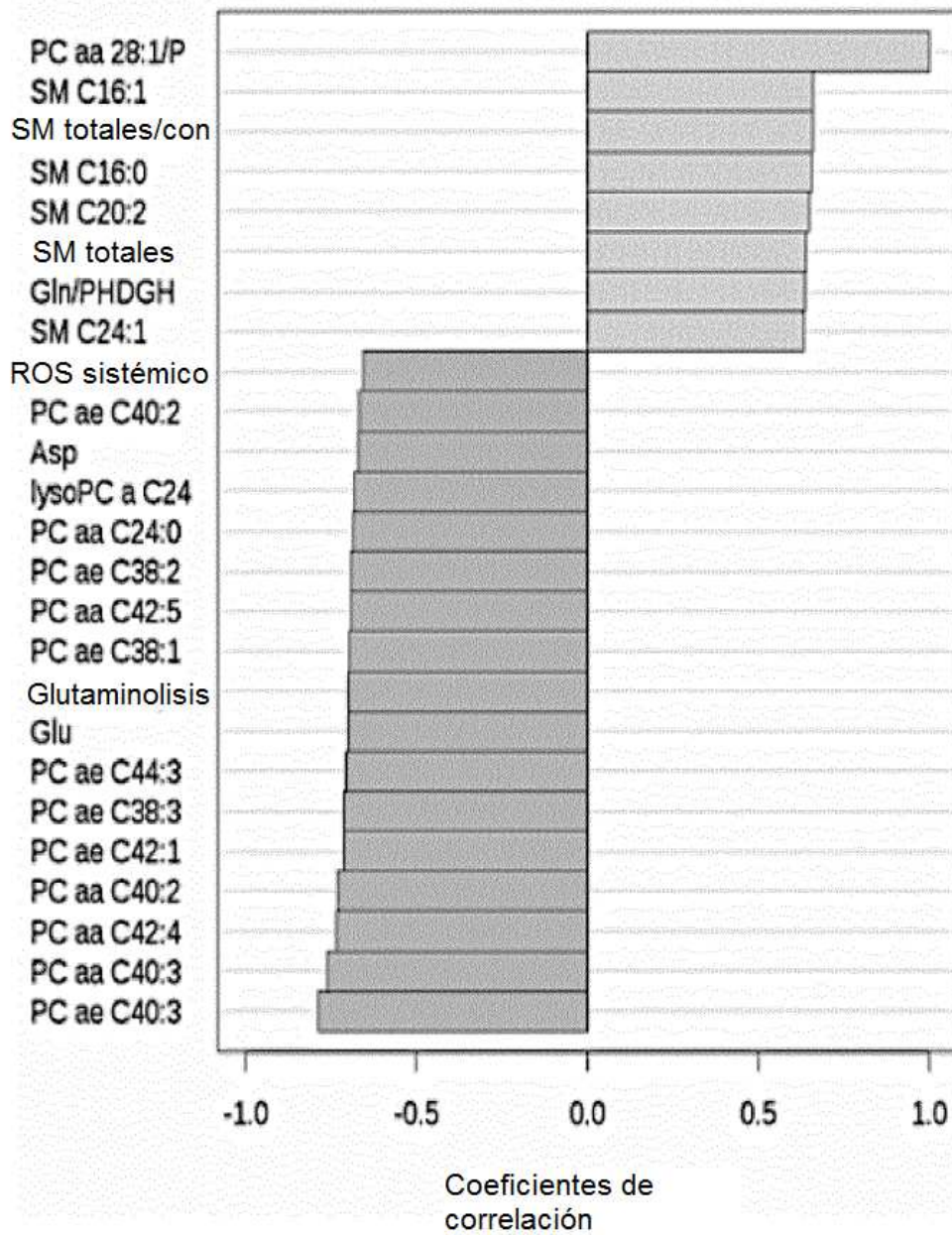


Figura 7A

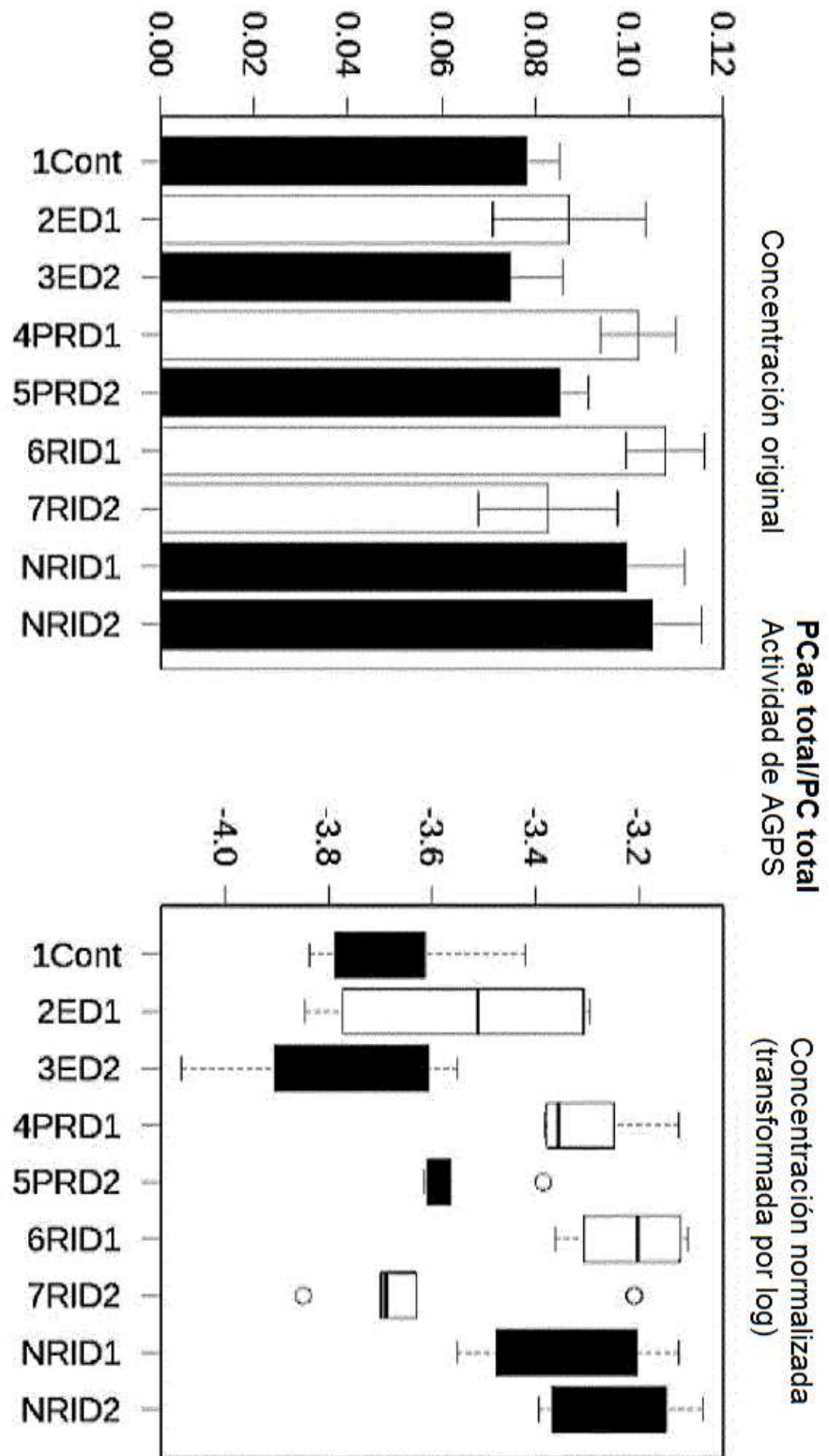


Figura 7B

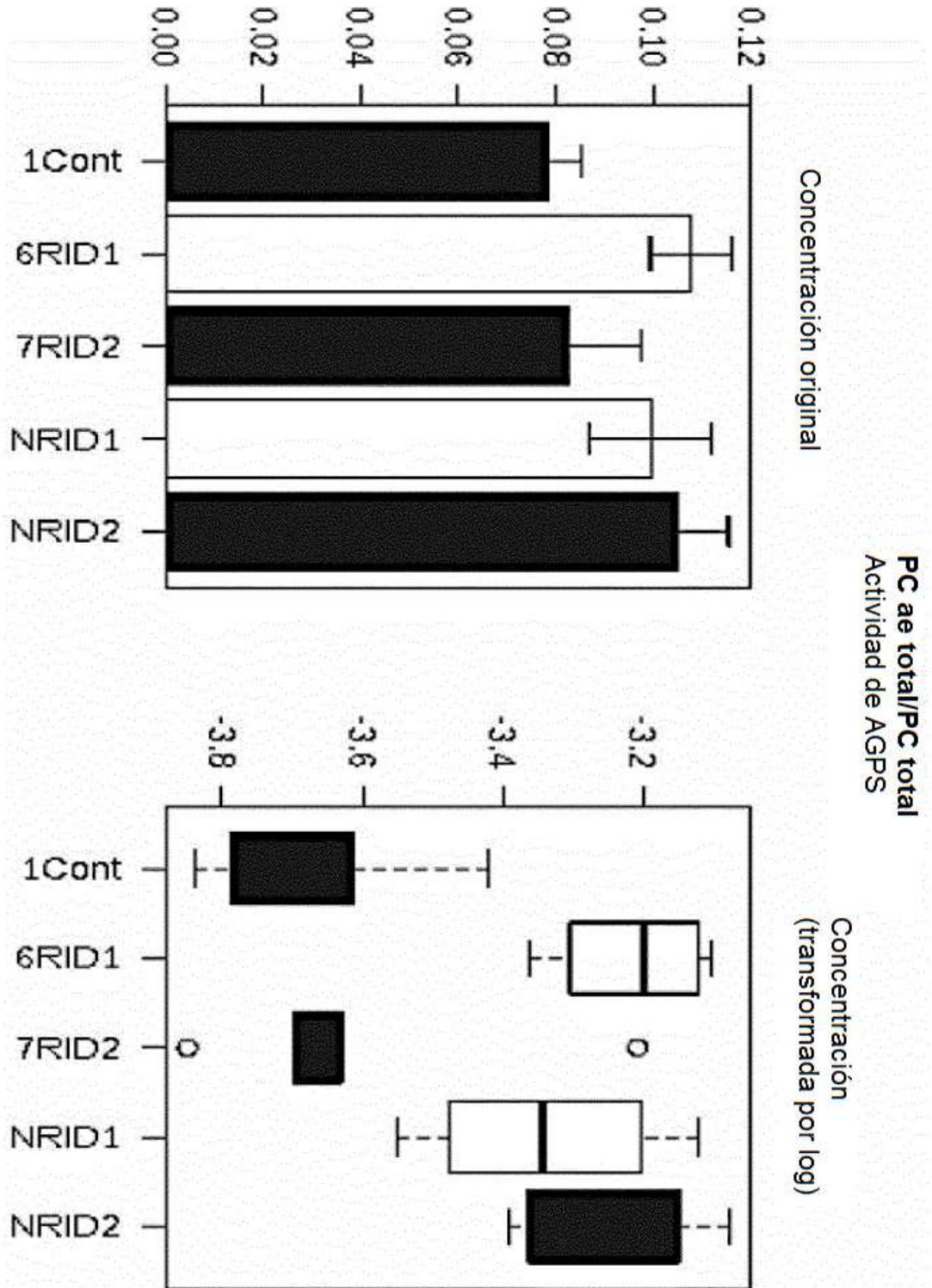


Figura 7C

25 compuestos superiores correlacionados con la actividad de AGPS

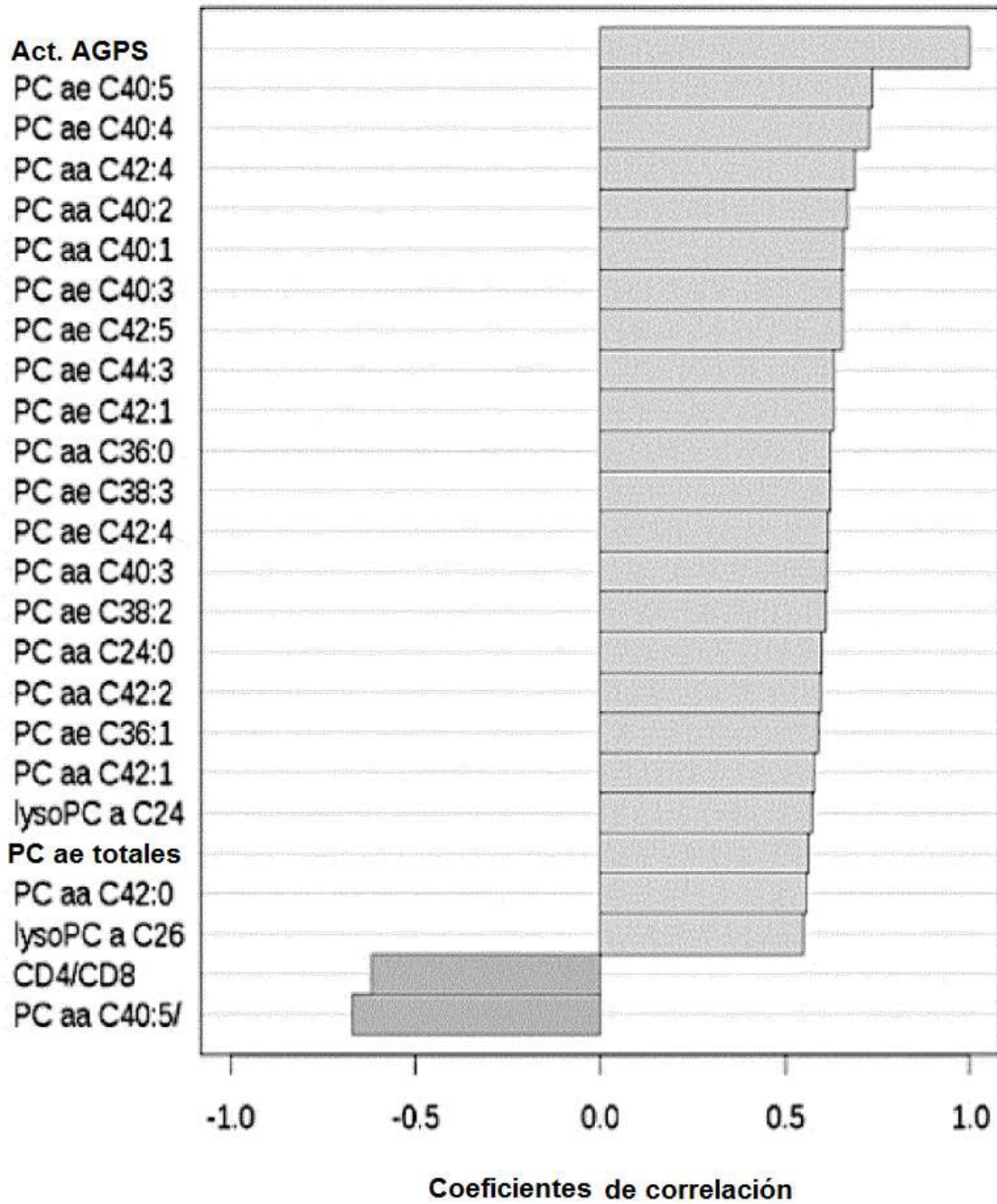


Figura 7D

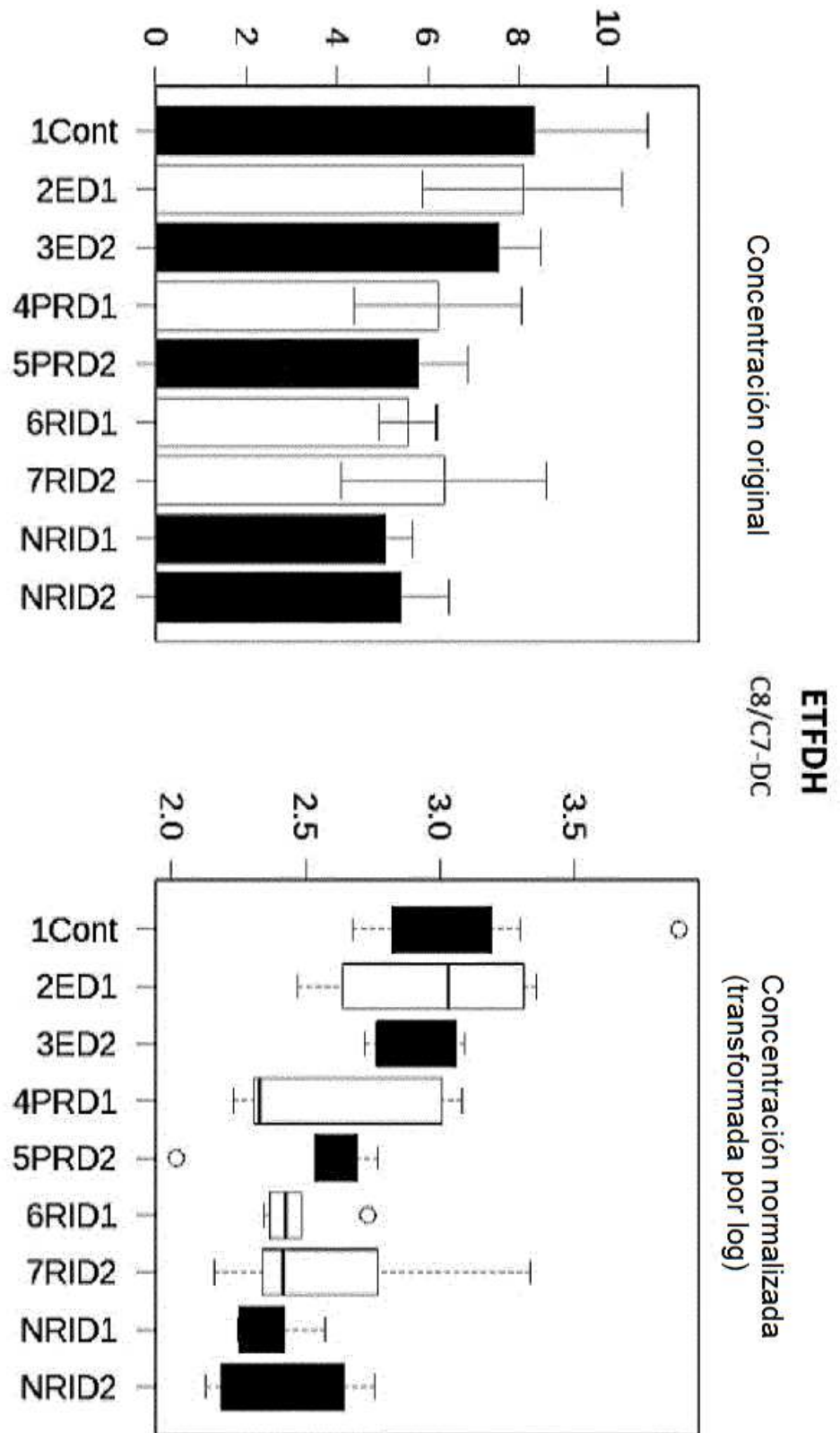


Figura 7E

25 compuestos superiores correlacionados con la C8/C7-DC

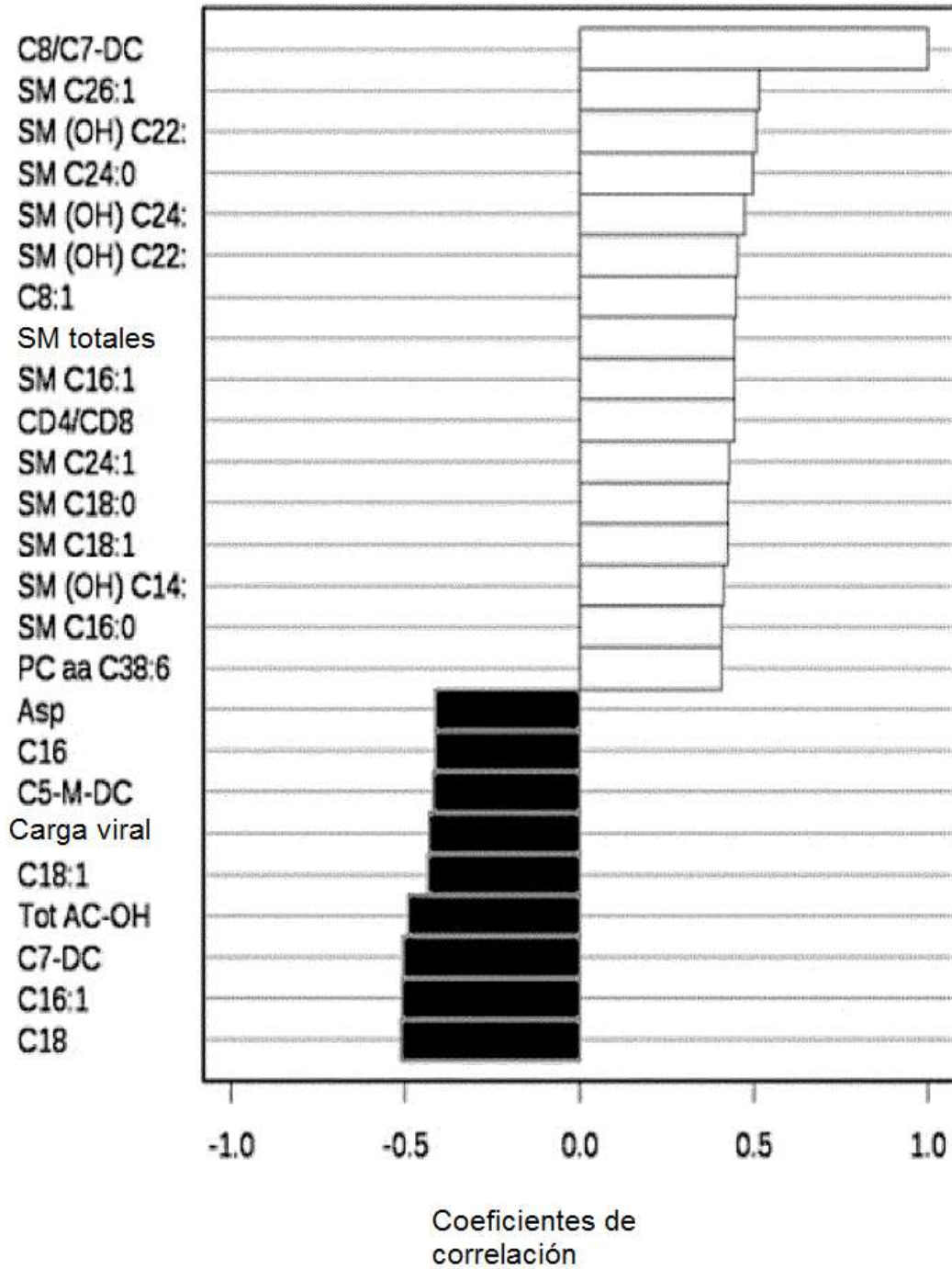


Figura 8

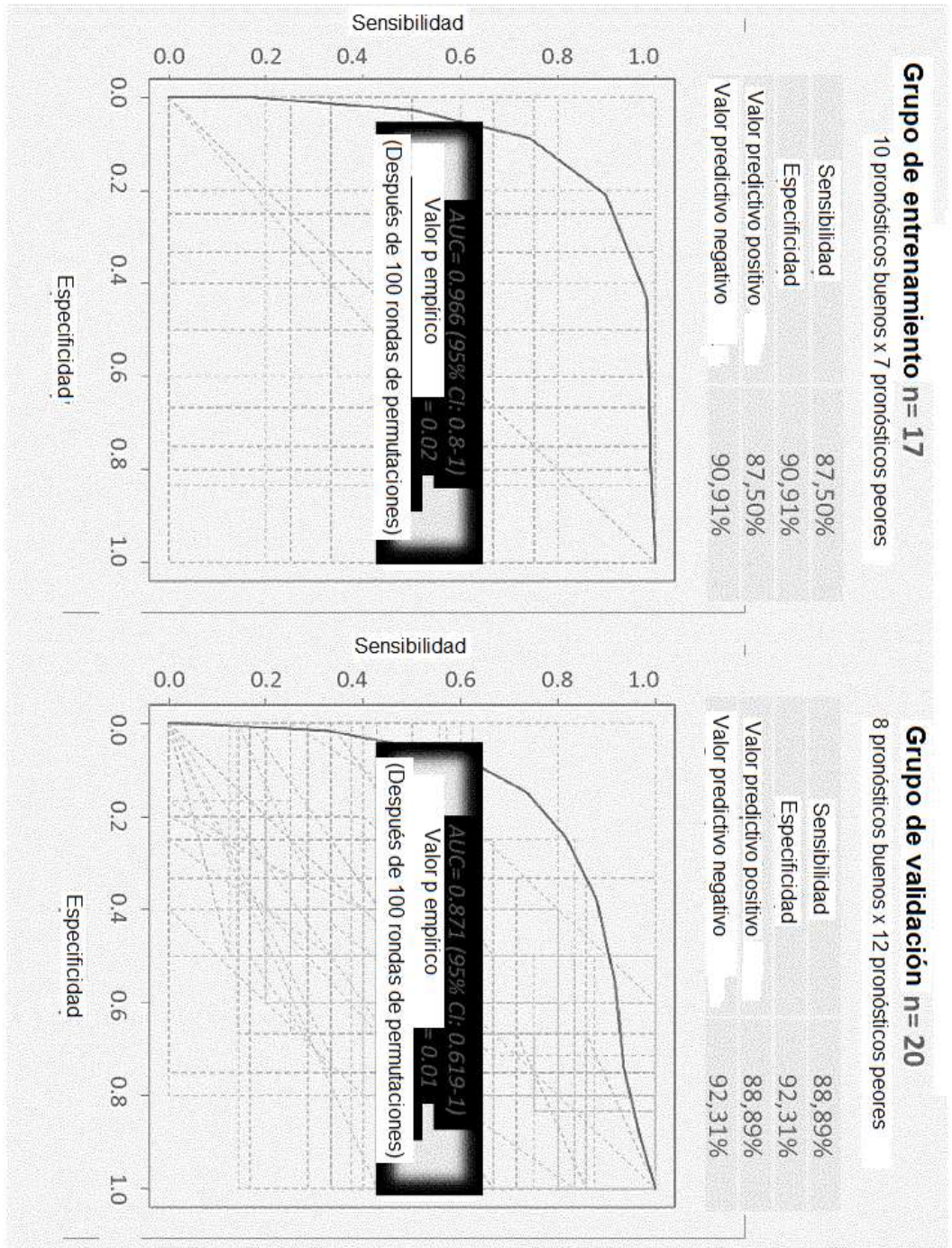


Figura 9

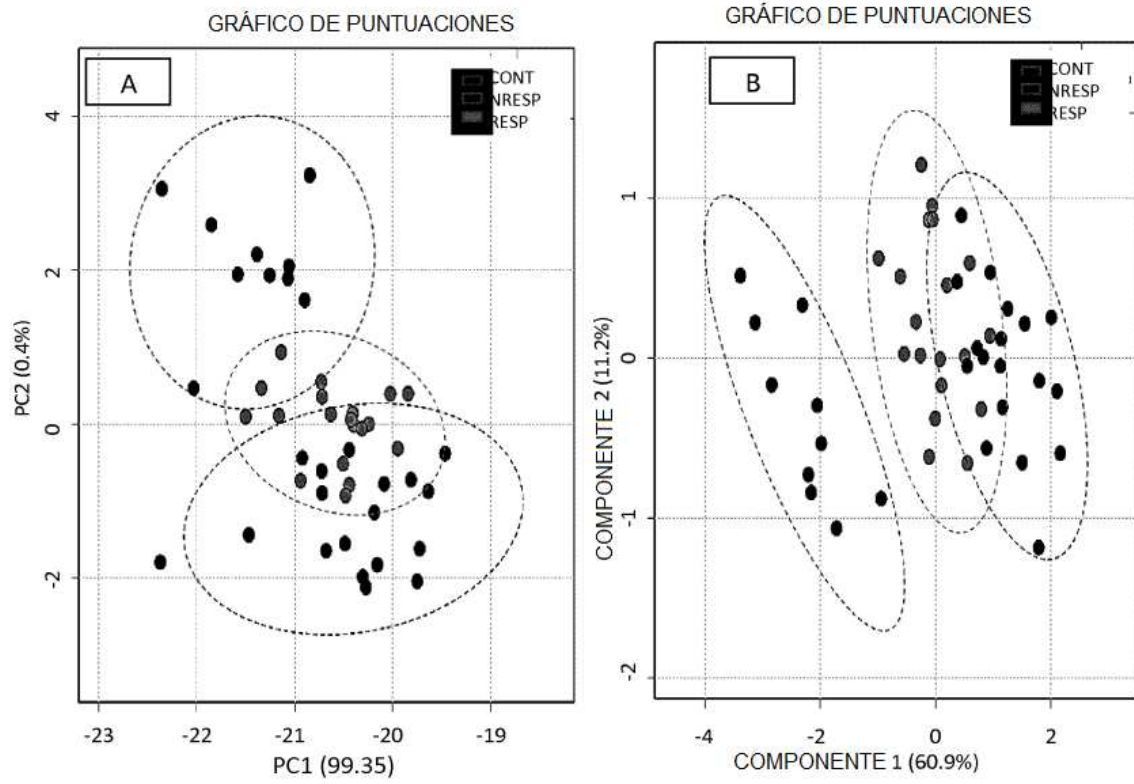


Figura 10A

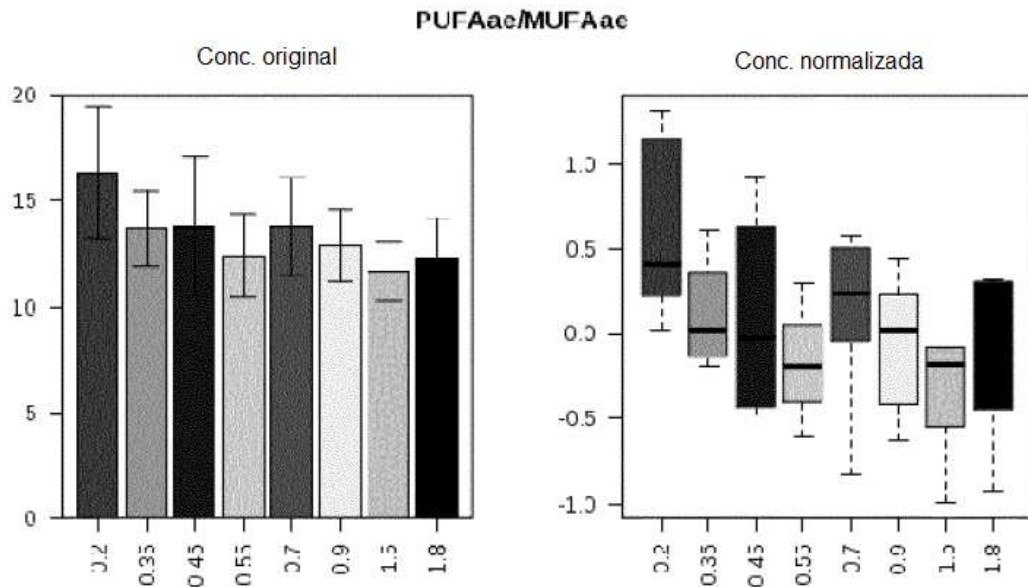


Figura 10B

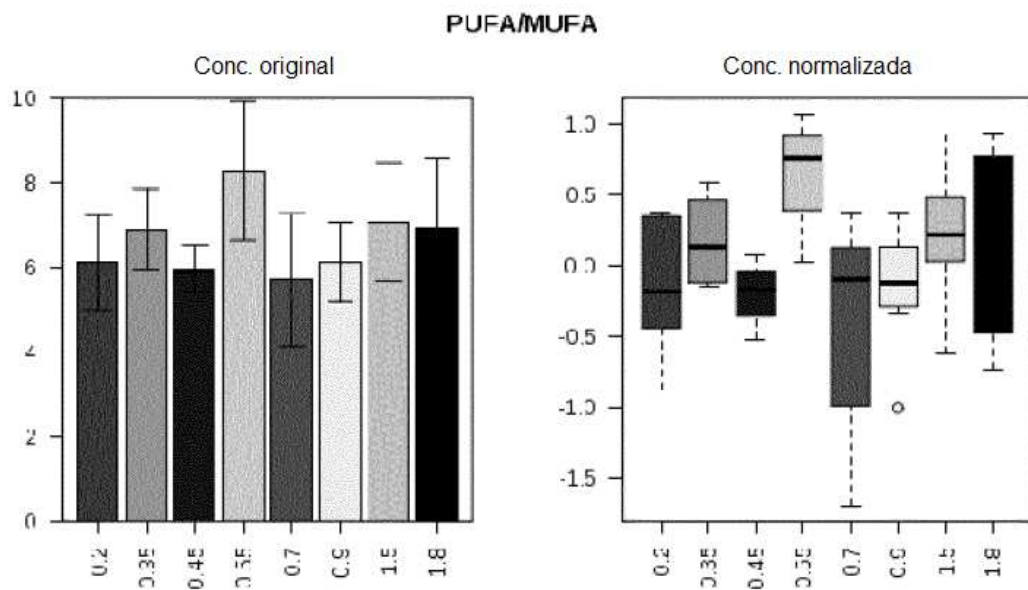


Figura 11A

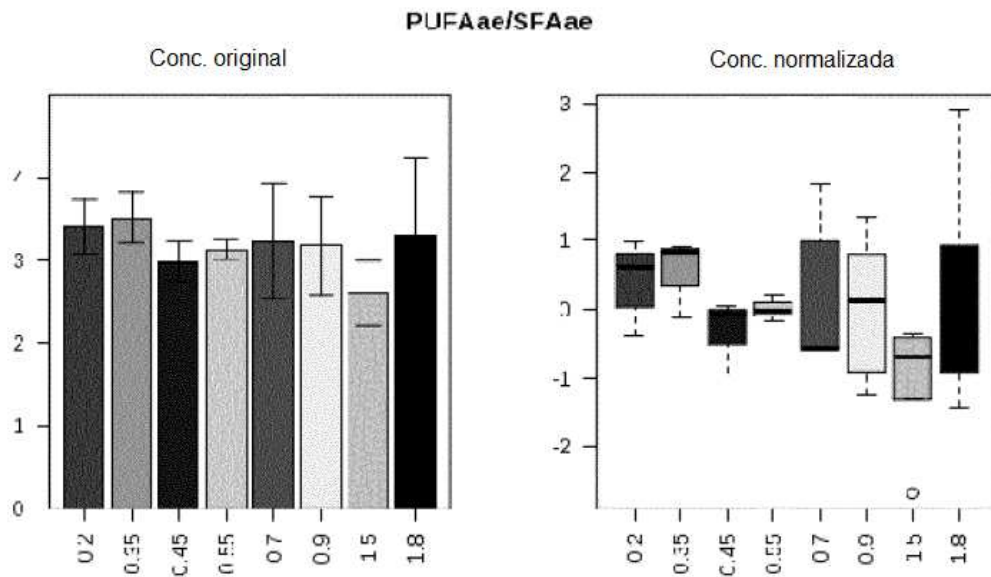


Figura 11B

