

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2010.03.10	(73) Titular(es): INSTITUT PASTEUR 25-28 RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS CÉDEX 15 FR
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.09.14	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.05.29 146/2013	(72) Inventor(es): MARIE-LISE GOUGEON FR BÉATRICE POIRIER-BEAUDOIN FR VALÉRIE SEFFER FR HÉLA SAIDI FR
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **HMGB1 E ANTICORPOS ANTI-HMGB1 EM DOENTES INFECTADOS COM VIH ESPECIALMENTE APRESENTANDO DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJECTO UM PROCESSO IN VITRO PARA QUANTIFICAR ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA A PROTEÍNA 1 DO GRUPO DE ELEVADA MOBILIDADE (HMGB1) CONTIDOS NUMA AMOSTRA, EM PARTICULAR UMA AMOSTRA DE SORO OU UMA AMOSTRA DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO OBTIDA DE UM DOENTE E TAMBÉM TEM POR OBJECTO A UTILIZAÇÃO DESTE PROCESSO NO PROGNÓSTICO E/OU NO DIAGNÓSTICO DE DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS. ESTES PROCESSOS SÃO APLICÁVEIS, EM PARTICULAR, PARA MONITORIZAR A INFECÇÃO POR VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (VIH) DE UM INDIVÍDUO, QUE SE SABE QUE ESTÁ INFECTADO COM VIH E TAMBÉM NO PROGNÓSTICO E/OU NO DIAGNÓSTICO DO ESTADO DE PROGRESSÃO DA SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (SIDA) OU DO ESTADO DE PROGRESSÃO PARA A SIDA, EM PARTICULAR O ESTADO DE PROGRESSÃO OU O ESTADO DE PROGRESSÃO EM DIRECÇÃO A DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS ASSOCIADOS COM A SIDA. FINALMENTE, A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM TEM POR OBJECTO UM PROCESSO PARA DETERMINAR A DEFICIÊNCIA IMUNITÁRIA OU O NÍVEL DE ACTIVAÇÃO IMUNITÁRIA DE UM DOENTE, EM PARTICULAR, UM DOENTE INFECTADO COM VIH.

RESUMO

HMGB1 E ANTICORPOS ANTI-HMGB1 EM DOENTES INFECTADOS COM VIH ESPECIALMENTE APRESENTANDO DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS

A presente invenção tem por objecto um processo *in vitro* para quantificar anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) contidos numa amostra, em particular uma amostra de soro ou uma amostra de líquido cefalorraquidiano obtida de um doente e também tem por objecto a utilização deste processo no prognóstico e/ou no diagnóstico de distúrbios neurológicos. Estes processos são aplicáveis, em particular, para monitorizar a infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH) de um indivíduo, que se sabe que está infectado com VIH e também no prognóstico e/ou no diagnóstico do estado de progressão da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) ou do estado de progressão para a SIDA, em particular o estado de progressão ou o estado de progressão em direcção a distúrbios neurológicos associados com a SIDA. Finalmente, a presente invenção também tem por objecto um processo para determinar a deficiência imunitária ou o nível de activação imunitária de um doente, em particular, um doente infectado com VIH.

DESCRIÇÃO

HMGB1 E ANTICORPOS ANTI-HMGB1 EM DOENTES INFECTADOS COM VIH ESPECIALMENTE APRESENTANDO DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Âmbito da invenção

O presente pedido de patente tem por objecto a quantificação da proteína HMGB1 ou de anticorpos específicos para HMGB1 numa amostra biológica, em particular, no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) e a sua respectiva correlação com a monitorização de infecção por VIH ou com a carga viral, assim como, processos de prognóstico do estado de progressão da SIDA e de distúrbios neurológicos associados com a SIDA.

Descrição da técnica relacionada

Pouco depois da infecção, o VIH 1 é capaz de penetrar no cérebro, o que, eventualmente, poderá resultar em complicações, associadas com o VIH1, no sistema nervoso central (SNC). A demência associada ao VIH (DAH, *HAD em inglês*) é clinicamente caracterizada por disfunções motoras e comportamentais que levam a convulsões, coma e à morte no prazo de 6 meses após o início. A encefalite por VIH, correlacionada patologicamente com a DAH, é caracterizada por astrogliose dispersa, stresse oxidante, desregulação de citocina/quimiocina e degeneração dos neurónios (Gonzalez-Scarano e Martin-Garcia, Nat Rev Immunol 2005, 5: 69-81). Uma vez que os neurónios não são infectados pelo VIH 1, o pensamento actual é que estas células são danificadas

indirectamente por quimiocinas pró-inflamatórias libertadas pelas células gliais activadas. A IP-10 (CXCL10) é uma quimiocina neurotóxica que é regulada em excesso na astroglia e tem sido sugerido que aumenta a infecção por retrovírus e medeia lesões dos neurónios. O aumento de IP-10 no LCR tem sido relatado em infecções por VIH e o seu nível está correlacionado com a carga viral de VIH no LCR (Cinque P et al. J Neuroimmunol 2005, 168: 154). Também tem sido relatada uma possível associação entre os níveis de proteína 1 quimio-atractiva de macrófagos (MCP-1 ou CCL2) no LCR e o desenvolvimento de DAH num grupo que tenha experimentado HAART com infecção avançada por VIH (Sevigny JJ, Albert SM, McDermott MP; et al. Neurology. 2004; 63: 2084). Outro estudo relatou uma associação entre os níveis de MCP-1 no plasma e a demência associada com o VIH (Sevigny et al. Arch. Neurol. 2007, 64: 97).

A proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) é uma proteína cromossómica que não é histona, que actua como uma citocina pró-inflamatória potente quando é segregada activamente a partir de macrófagos, monócitos, células dendríticas ou outras células activadas, tal como as células assassinas naturais (AN, *em inglês* NK). A HMGB1 comporta-se como um desencadeador de inflamação, atraindo células inflamatórias e de reparação de tecidos, recrutando células estaminais e promovendo a sua proliferação. Além disso, a HMGB1 activa as células dendríticas (CD) e promove a sua maturação funcional e a sua resposta a quimiocinas nos nódulos linfáticos. Os leucócitos activados segregam activamente HMGB1 no microambiente. Assim, a HMGB1 actua no modo de autocrina/paracrina e sustem a reparação a longo prazo e os programas de defesa (Bianchi e Manfredi, 2007; Lotze e Tracey, 2005).

Sobajima et al, Clin Exp Immunol (1998) 111: 402-407 descrevem a prevalência de anticorpos citoplásmicos perinucleares anti-neutrófilos (P-ANCA) dirigidos contra HMGB1 na colite ulcerosa.

Em estudos recentes, a HMGB1 tem mostrado que provoca a replicação do VIH em CD infectadas com VIH, contribuindo assim para a constituição de reservatórios virais nas CD (Saidi H, Melki M-T, Gougeon M-L, PLoS One 2008). Considerando que as CD são os primeiros alvos do VIH nas primeiras horas da infecção da mucosa, que vai então migrar para órgãos linfóides secundários, em que vai transmitir o VIH às células T, estas observações levantam a questão do envolvimento *in vivo* de HMGB1 na provocação da replicação viral e no enchimento dos reservatórios virais. A HMGB1 foi produzida durante um cruzamento entre CD infectadas por VIH e células AN activadas, resultando também na resistência das CD infectadas por VIH à morte pelas células AN. A sobrevivência das CD estava associada a uma sobre-regulação de dois inibidores de apoptose, c-IAP2 e c-FLIP em CD infectadas, um processo induzido por HMGB1 (Melki M-T et al. PLoS Pathogens 2010, em impressão). O bloqueio da actividade de HMGB1 por inibidores específicos, tais como, glicirrizina ou anticorpos de bloqueio, anula a replicação do VIH em CD infectadas (Saidi H, Melki M-T, Gougeon M-L, PLoS One 2008) e restaura a susceptibilidade das CD infectadas à morte por AN (Melki M-T et al. PLoS Pathogens 2010, em impressão). Estas observações, que providenciam novas visões sobre a forma como o VIH se apodera das CD para promover a disseminação viral e para manter a viabilidade de reservatórios de longo prazo, constituíram o objecto do pedido de patente PCT/EP2009/06828.

Estas observações também levantam a questão do envolvimento *in vivo* de HMGB1 no desencadear da replicação

viral e no enchimento dos reservatórios virais. Para colocar esta questão, tem-se quantificado a concentração de HMGB1 no soro em doentes infectados com VIH (Elisa, ensaio de Shino, IBL) para avaliar a contribuição *in vivo* da HMGB1 em circulação para a carga viral do VIH no plasma e para a evolução da doença. Além disso, considerando que os auto-anticorpos específicos para HMGB1 podiam ser encontrados em doenças auto-imunes, tais como, a LES (lúpus) (Hayashi et al., 2009), desenvolveu-se um ensaio específico de ELISA para verificar se os anticorpos específicos anti-HMGB1 no soro de doentes infectados com VIH foram detectados na doença por VIH.

A medição tanto de HMGB1 como de anticorpos anti-HMGB1 em soros de doentes foi referida no pedido de patente PCT/EP2009/06828. Daí se tiraram as seguintes conclusões:

- (i) a infecção crónica por VIH provoca a produção de HMGB1, detectada em níveis crescentes no soro de doentes infectados, o que por sua vez, induz a produção a produção de anticorpos de neutralização;
- (ii) detecta-se uma correlação inversa entre HMGB1 e os anticorpos anti-HMGB1, indicando que quando a HMGB1 está ligada aos anticorpos, já não é detectada nas amostras de soro;
- (iii) quanto mais anticorpos anti-HMGB1 existirem no soro (o que significa que foi produzida mais HMGB1 anteriormente) no soro, menos células T CD4 existem, o que sugere que níveis elevados de anticorpos anti-HMGB1 no soro estão associados à evolução da doença; e
- (iv) uma terapia anti-retroviral potente (HAART) reduz os níveis no soro tanto de HMGB1 como de anticorpos anti-HMGB1 e pode normalizá-los para os níveis de base.

O pedido de patente PCT/EP2009/06828 também coloca a hipótese de que, quanto mais anticorpos anti-HMGB1 existirem no soro, menor será a carga viral no soro. Contudo, esta hipótese não tem sido confirmada por meio de análises das experiências realizadas e também num grupo maior de doentes. Na verdade, a correlação estabelecida entre anticorpos anti-HMGB1 e a carga viral no soro descrita na patente PCT/EP2009/06828 tem ainda demonstrado derivar de uma análise estatística imprópria dos resultados derivados de um grupo de doentes que englobam tanto doentes não tratados como doentes tratados (tendo o tratamento um efeito na carga viral).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto a questão dos processos que se baseiam na quantificação de HMGB1 e de anticorpos anti-HMGB1, para monitorizar a infecção por VIH e, nalguns casos, para monitorizar a carga viral, assim como a questão da possível implicação de HMGB1, anticorpos anti-HMGB1 e outras quimiocinas no processo de prognóstico de ocorrência de SIDA e nos distúrbios neurológicos associados com a SIDA ou com a infecção por VIH.

A HMGB1 é uma proteína bem conhecida que aparece no núcleo e é também conhecida por ser uma citocina. As características físicas e funcionais de HMGB1 estão descritas e são aqui incorporadas com a Lotze, et al., Nature Reviews, Immunology 5: 351 (2005).

Os anticorpos que se ligam a HMGB1 são conhecidos e podem ser produzidos por processos bem conhecidos na técnica. Um exemplo de anticorpos anti-HMGB1, disponíveis comercialmente, são os anticorpos policlonais primários de coelho contra HMGB1 humana (Abcam ref. 18256), que se dirigem

contra o péptido sintético conjugado com KLH derivado dos resíduos 150 até ao terminal C da HMGB1 humana. Estes processos incluem os que produzem anticorpos policlonais contra HMGB1 e anticorpos monoclonais contra HMGB1 ou contra fragmentos específicos de HMGB1. Os anticorpos utilizados nas aplicações terapêuticas têm a característica de serem bloqueadores, por exemplo, interferem especialmente com a replicação de VIH induzida por HMGB1 em células dendríticas infectadas. Estes anticorpos derivam, preferencialmente, das mesmas espécies do indivíduo ao qual vão ser administrados e reconhecem ou são induzidos com a HMGB1 das mesmas espécies às quais serão administrados. Estes anticorpos poderão ter diferentes isótipos, tais como, os isótipos IgA, IgG ou IgM. Os fragmentos de anticorpos que se ligam a HMGB1 podem também ser utilizados incluindo Fab, Fab₂ e anticorpos de cadeia simples ou os seus fragmentos.

A presente invenção diz respeito a um processo *in vitro* para a quantificação de anticorpos, especialmente, o total de anticorpos, específicos para HMGB1 contida numa amostra de líquido cefalorraquidiano obtido de um indivíduo, compreendendo (a) se os anticorpos a serem quantificados são anticorpos totais, o tratamento da amostra de líquido cefalorraquidiano por meio de um tratamento ácido para dissociar os complexos imunitários que envolvem a HMGB1 encontrada na amostra, preferencialmente com glicina 1,5 M, a um pH baixo; (b) em qualquer caso, fazendo contactar a referida amostra biológica, eventualmente tratada, com a proteína HMGB1 natural ou os seus derivados; e (c) a quantificação dos anticorpos, especialmente o número total de anticorpos específicos para HMGB1.

Numa modalidade preferida, o tratamento com ácido consiste em pôr em contacto a amostra de líquido

cefalorraquidiano com uma solução de dissociação ácida, com um pH baixo, preferencialmente, um pH entre 1 e 3, escolhido para separar a proteína HMGB1 dos anticorpos aos quais está imunologicamente ligada na amostra de líquido cefalorraquidiano, sem alterar a capacidade de ligação deste anticorpo. Numa modalidade particular, a solução de dissociação ácida é glicina (por exemplo, 1,5 M) a um pH baixo, preferencialmente, entre pH 1 e 3 (por exemplo, 1,85). Pára-se então o tratamento ácido com tampão de neutralização (tal como, Tris, por exemplo, Tris 1,5 M, a pH 9). Noutra modalidade preferida, em combinação ou não com a anterior, a incubação com a solução de dissociação ácida é realizada a uma temperatura entre 20 e 37 °C, preferencialmente, a 25 °C, e/ou a etapa de neutralização tem lugar em gelo.

A expressão "*líquido cefalorraquidiano*" ou "*LCR*" refere-se ao fluido que ocupa o espaço sub-araquenóidico e o sistema ventricular circundante e interior do cérebro. O LCR ocupa o espaço entre a matéria araquenóide e a *pia mater*. Constitui o conteúdo de todos os ventrículos intra-cerebrais, cisternas e sulcos, assim como, o canal central da espinal-medula. O LCR é normalmente obtido por meio de punção lombar.

No presente pedido de patente, o termo "*quantificação*" engloba o termo "*quantificar*" e qualquer determinação informativa apropriada para a proteína HMGB1 ou anticorpos específicos dela.

Por "*circulação*", entende-se que os anticorpos residuais encontrados na amostra, em particular, no soro ou no LCR, isto é, os anticorpos que se encontram numa forma não complexada (com a proteína HMGB).

Por "total", entende-se a soma ou uma quantidade combinada de anticorpos circulantes e anticorpos complexados sob o ponto de vista imunológico.

Todos os processos descritos no presente pedido de patente e implementados no LCR podem ser realizados por analogia, isto é, do mesmo modo, noutras amostras biológicas e, em particular, no soro, sangue, plasma, saliva ou num tecido.

Numa modalidade particular, a presente invenção também tem por objecto um processo *in vitro* para monitorizar a infecção por VIH, por meio da quantificação dos anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) especialmente os anticorpos totais específicos para a HMGB1 contida em amostras de fluidos que ou são amostras de soro ou amostras de líquido cefalorraquidiano ou ambas as amostras obtidas de um indivíduo infectado com VIH, compreendendo:

- a) o contacto da referida amostra de fluido com a proteína HMGB1 natural ou com derivados da proteína HMGB1, desde que estes derivados se liguem aos anticorpos específicos para HMGB1; e
- b) quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1 em que a quantidade de anticorpos anti-HMGB1 detectada está correlacionada com o prognóstico da infecção, em particular, quando a referida correlação é independente da carga viral no referido indivíduo.

A etapa de tratamento descrita aqui para preparar os anticorpos totais, específicos para HMGB1 na amostra de líquido cefalorraquidiano aplica-se, do mesmo modo, para se obter esses anticorpos a partir de uma amostra de soro.

Os processos da presente invenção são apropriados para monitorizar o estado clínico de um indivíduo infectado com VIH, especialmente VIH-1 ou VIH-2.

O "estado clínico" do indivíduo refere-se ao status clínico do indivíduo após a infecção com VIH ou ao risco desse indivíduo progredir para a SIDA ou para distúrbios neurológicos associados com VIH.

A presente invenção também tem por objecto um processo *in vitro* para monitorizar a infecção por VIH num indivíduo, que se sabe que está infectado com VIH, compreendendo a quantificação dos anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1), contida numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtida desse indivíduo, em que os anticorpos destinados à quantificação ou são anticorpos totais específicos para HMGB1 ou são fracções daqueles anticorpos em circulação (anticorpos circulantes) ou as suas fracções complexadas sob o ponto de vista imunológico.

Os processos para monitorizar a infecção por VIH, para avaliar a deficiência imunitária ou para determinar o nível de activação imunitária, assim como os processos de prognóstico aqui descritos, incluindo o caso em que o referido processo é realizado com uma determinação paralela da carga viral, podem basear-se quer na quantificação dos anticorpos em circulação específicos para HMGB1, quer na quantificação dos anticorpos totais específicos para HMGB1 ou na quantificação da fracção do complexo de HMGB1 imunológica/ anticorpos específicos.

Numa modalidade particular, todos estes processos baseiam-se quer na quantificação dos chamados anticorpos

residuais circulantes, anticorpos específicos ou anticorpos específicos totais.

A quantificação dos anticorpos específicos totais para HMGB1 pode ser a preferida.

Quando a quantificação se baseia nos anticorpos totais específicos para HMGB1, os processos da presente invenção também incluem uma etapa apropriada para a dissociação de complexos imunológicos formados com anticorpos específicos de HMGB1 e, por exemplo, os processos da presente invenção utilizam ou incluem o processo de quantificação baseado no tratamento com ácido conforme descrito antes e, em particular, o descrito nos exemplos. Quando a quantificação se baseia nos anticorpos circulantes específicos para HMGB1, a referida etapa de dissociação não é necessária.

Numa modalidade particular, a referida quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1 realiza-se por contacto de uma amostra de líquido cefalorraquidiano (obtido de um indivíduo) com a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) ou derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem aos anticorpos específicos para HMGB1. O contacto da amostra do líquido cefalorraquidiano com a referida proteína, assim como a quantificação dos complexos formados, realizam-se *in vitro*.

Entende-se que nos processos concebidos para monitorizar a infecção por VIH, em particular quando acompanhados pela determinação da carga viral, para avaliar a imunodeficiência e para determinar o nível de activação imunitária, assim como os processos de prognóstico da presente invenção, é possível utilizar a sequência da proteína HMGB1 de comprimento completo (com origem em mamíferos, preferencialmente, com

origem humana, tal como definido pelo número de acesso NP_002119) ou qualquer péptido (10 a 30 resíduos de aminoácidos) ou polipéptido (30 a 215 resíduos de aminoácidos, preferencialmente, 30 a 50 ou 30 a 100 ou 30 a 150 resíduos) derivados de HMGB1 (derivados da proteína HMGB1) desde que estes derivados se liguem a anticorpos específicos para HMGB1 e/ou permitam quantificar os anticorpos anti-HGB1. Esses derivados seleccionam-se no grupo que consiste numa HMGB1 recombinante (por exemplo, a proteína comercializada como HMG biotech HM-115), uma parte reactiva sob o ponto de vista imunológico de HMGB1, uma parte reactiva sob o ponto de vista imunológico de HMGB1 cuja sequência é comum às proteínas de HMGB1 de várias origens. Um desses exemplos é a proteína BOXB recombinante de HMGB1 correspondendo à sequência comum a seres humanos e murganhos de HMGB1 (HMG biotech HM-051).

Por "*doente infectado por VIH*" ou "*um indivíduo que se sabe que vai ser infectado com VIH*" entende-se um indivíduo ou um doente a quem tenha sido feito um diagnóstico positivo para o vírus VIH e para quem a infecção por VIH tenha sido confirmada no seguimento de análises relevantes. Os doentes infectados por VIH podem ser classificados de acordo com vários parâmetros, tais como, carga viral, número de células T CD4 ou sintomas clínicos de SIDA. Nos doentes que sofrem de distúrbios neurológicos há uma classificação particular que se baseia nesses distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH, conforme é determinado pelos clínicos, tal como se segue;

Estádio 1, com análises neurofisiológicas (NF) normais.
Estádio 2, com pelo menos com um DP (desvio padrão) 2 abaixo da média, num ensaio cognitivo ou um DP de pelo menos 1 abaixo do que 1 ensaio exploratório do mesmo

domínio. Estes resultados definem o estado clínico de DN (défice neuropsicológico).

Estádio 3, incluindo os doentes com critérios para DNA (deficiência neurocognitiva assintomática).

Estádio 4, incluindo os doentes com DCM (distúrbios neurocognitivos menores).

Tal como se descreveu antes, a detecção ou a monitorização de infecção por VIH por meio da realização da detecção ou da quantificação de HMGB1 ou de anticorpos anti-HMGB1 em amostras de soro podem ser acompanhadas pela determinação da carga viral através de técnicas bem conhecidas.

Numa modalidade particular da presente invenção, a determinação da referida carga viral pode ser conseguida através dos processos das próprias invenções, especialmente quando os doentes diagnosticados não são tratados da infecção por VIH.

A presente invenção tem assim também por objecto, numa modalidade particular, um processo para monitorizar a carga viral de VIH de um indivíduo que se sabe que está infectado com VIH e que compreende a realização do processo de quantificação dos anticorpos totais específicos para HMGB1, numa amostra, em particular, numa amostra de soro ou de líquido cefalorraquidiano, em que, quanto mais anticorpos específicos para HMGB1 houver, maior será a carga viral. Esta abordagem para monitorizar a carga viral (CV) seria relevante num doente que se soubesse que estava infectado com VIH e que não estava a ser tratado para esta infecção no momento da monitorização da carga viral ou em doentes cuja CV não está controlada.

Por "*carga viral*" entende-se quer o ARN de VIH (que deriva de partículas virais e que está presente no plasma) ou o ADN de VIH (que está integrado no genoma celular e presente nas células). Numa modalidade particular, os processos da presente invenção que se baseiam na quantificação de anticorpos específicos para HMGB1 são apropriados para monitorizar a carga viral de ARN de VIH.

Por "*monitorizar da infecção por VIH*", entende-se o acompanhamento da infecção por VIH ao longo do tempo. A infecção por VIH pode ser avaliada por vários parâmetros, tais como, a medição da carga viral, a contagem das células T CD4 e/ou os parâmetros clínicos associados com a evolução da doença. A progressão da infecção por VIH, isto é, a diminuição, o aumento ou a estabilidade dos parâmetros medidos, em comparação com um ensaio anterior, irão ditar a forma de tratar o doente. A progressão da infecção por VIH reflecte a replicação do VIH e/ou a integração do genoma de VIH no genoma das células-alvo.

A presente invenção também tem por objecto um processo de prognóstico *in vitro* quer do estado de progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou o estado de progressão para o aparecimento da SIDA, de um doente infectado com VIH ou o estado de progressão para distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH, compreendendo a realização de um processo de quantificação ou do processo de monitorização da infecção por VIH descrito antes, numa amostra, em particular, numa amostra de soro ou no líquido cefalorraquidiano obtido de um doente após infecção por VIH e, preferencialmente, durante a infecção primária ou aguda ou durante a infecção crónica e em que, quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1, maior é o risco de desenvolver SIDA ou um estado avançado de SIDA e, em

particular, maior é o risco para desenvolver distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH.

O termo "*prognóstico*" refere-se à possibilidade de avaliar, no momento da realização da quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1 numa amostra obtida de um doente, o risco que esse doente tem de desenvolver SIDA ou de progredir para a SIDA ou de progredir para distúrbios neurológicos. A expressão "*estado de progressão da SIDA ou para a SIDA*" refere-se aos vários estádios encontrados na progressão da SIDA ou em direcção à SIDA e, em particular, refere-se ao sistema de estágios de doenças da WHO para a infecção por VIH e a doença produzida e actualizado pela Organização Mundial de Saúde que estão resumidos aqui a seguir. Estádio I: a doença por VIH é assintomática e não é categorizada como SIDA; Estádio II: inclui manifestações mucocutâneas menores e infecções recorrentes do tracto respiratório superior; Estádio III: inclui diarreia crónica inexplicada durante mais do que um mês, várias infecções bacterianas e tuberculose pulmonar; e Estádio IV: inclui toxoplasmose do cérebro, candidíase do esófago, traqueia, brônquios ou pulmões e sarcoma de Kaposi.

A expressão "*estádio da progressão para distúrbios neurológicos*" refere-se à classificação de estádios de distúrbios neurológicos (1 a 4), tal como descrito antes.

Mais particularmente, a presente invenção tem por objecto um processo de prognóstico *in vitro* quer do estado de progressão de distúrbios neurológicos associados com a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) quer do estado de progressão para distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH ou com a SIDA de um doente infectado com VIH, que compreende a realização do processo de quantificação

ou do processo de monitorização da infecção por VIH descrito antes, numa amostra, em particular, numa amostra de soro ou numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente após a infecção e, preferencialmente, durante a infecção primária ou aguda ou durante a infecção crónica e em que, quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1, maior é o risco de desenvolver distúrbios neurológicos associados com a SIDA ou desenvolver distúrbios neurológicos avançados associados com a SIDA ou distúrbios neurológicos de um estágio avançado de SIDA.

A expressão "*distúrbios neurológicos associados com a síndrome de imunodeficiência adquirida*" ou "*distúrbios neurológicos associados com a SIDA*" ou "*distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH*" englobam distúrbios neurológicos do sistema nervoso, que são causados directamente pelo vírus VIH, por certos cancros e/ou por infecções oportunistas, assim como, distúrbios de origem desconhecida que são influenciados mas que não se sabe se são causados directamente pelo vírus. Alguns destes distúrbios neurológicos associados com a SIDA podem ser característicos do estado de progressão da doença, tal como se definiu antes. Exemplos de distúrbios neurológicos associados com a SIDA são o complexo da demência da SIDA (CDS) ou encefalopatia associada com VIH, linfomas do sistema nervoso central, meningite criptocócica, encefalite por citomegalovírus (CMV), encefalite e mielite causada pelo vírus do herpes zoster, neuropatia (neuropatia periférica e polineuropatia sensorial distal), neuro-sífilis, leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), encefalite por toxoplasma ou toxoplasmose cerebral e mielopatia vacuolar. Alguns doentes com a carga viral (CV) controlada, que não estão no estágio de SIDA podem desenvolver distúrbios neurológicos. A seguir descreve-se uma

classificação clínica respeitante a estes distúrbios neurológicos.

A presente invenção também tem por objecto um processo *in vitro* para a avaliação da deficiência imunitária (ou imunodeficiência) de um indivíduo que se sabe estar infectado com VIH e que compreende a realização do processo de quantificação ou o processo de monitorização da infecção por VIH descrita antes, numa amostra, em particular numa amostra de soro ou numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtida do referido indivíduo, em que quanto mais anticorpos específicos de HMGB1, mais elevada é a deficiência imunitária. A imunodeficiência observada no seguimento da infecção é o resultado da diminuição das células T CD4 que se demonstrou na presente invenção que estão correlacionadas negativamente com o nível de anticorpos específicos de HMGB1.

Um processo *in vitro* para a determinação do nível de activação imunitária, especialmente, activação imunitária persistente ou activação imunitária persistente em alguns compartimentos do corpo, provocando, especialmente, estados de inflamação persistente num indivíduo que sabe que está infectado com VIH, compreendem a realização de um processo de quantificação descrito antes numa amostra, em particular, numa amostra de soro ou numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtida do referido indivíduo, em que quanto mais anticorpos específicos para HMGB1, mais a activação imunitária é persistente e tudo isto faz também parte da presente invenção. A activação imunitária persistente (ou crónica) está associada com uma expressão elevada de marcadores de activação em células T CD8, em particular, marcadores CD38 e/ou HLA-DR. Por isso, a presente invenção tem posto em evidência que um elevado nível de anticorpos específicos de HMGB1 está correlacionado com um

elevado nível tanto de células T CD8⁺, CD38⁺ como de células T CD8⁺, HLA-DR⁺.

A activação imunitária refere-se, em particular, à activação imunitária observada em doentes na fase aguda de infecção por VIH ou à activação imunitária observada em doentes com infecção crónica por VIH, especialmente quando o referido doente não está sob tratamento (ART) ou apresenta distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH.

Cada um e todos os processos *in vitro* descritos no presente pedido de patente, eventualmente ainda compreendem a quantificação de outras moléculas encontradas na amostra (tal como na amostra de soro ou líquido cefalorraquidiano) e, em particular, a quantificação de quimiocinas. Exemplos de quimiocinas que podem ser analisadas e quantificadas, independentemente, são a quimiocina IP-10 e a quimiocina MCP-1. A quimiocina IP-10 humana (proteína induzida pelo interferão gama de 10 kDa) é também chamada de ligando de quimiocina (elemento C-X-C) 10 ou CXCL10, e está referenciada com o número de acesso da NCBI NP_001556); a quimiocina humana MCP-1 (para monócito de proteína 1 quimiotáctica) é também designada por ligando 2 de quimiocina (elemento C-C) (CCL2) e está referenciada com o número de acesso da NCBI NP_002973).

Quando aplicado a moléculas e, em particular, a quimiocina IP-10 e a quimiocina MCP-1, o termo "quantificação" ou "quantificando" engloba o termo "quantificar" e qualquer determinação informativa apropriada sobre o nível de quimiocina IP-10 e de quimiocina MCP-1.

Em particular, a presente invenção tem por objecto um processo *in vitro* para monitorizar o estado de um indivíduo

que se sabe que está infectado com VIH, compreendendo a realização do processo de quantificação descrito antes (quantificação de anticorpos específicos para HMGB1) e uma etapa para quantificar a quimiocina IP-10 e/ou a quimiocina MCP-1, numa amostra, em particular, numa amostra de soro ou numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtidas desse indivíduo.

Noutra modalidade, a presente invenção também tem por objecto um processo *in vitro* de prognóstico quer do estado de progressão dos distúrbios neurológicos associados com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou com a infecção por VIH em geral ou o estado de progressão para distúrbios neurológicos associados com a SIDA ou com a infecção generalizada por VIH de um doente infectado com VIH, compreendendo a realização de um processo de quantificação ou um processo para a monitorização da infecção por VIH descrito antes (quantificação de anticorpos específicos para HMGB1) e as etapas para quantificar a quimiocina IP-10 e/ou a quimiocina MCP-1, numa amostra, em particular numa amostra de soro ou numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente após a infecção e em que quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1 e maior forem os níveis de quimiocina IP-10 e/ou maiores forem os níveis de quimiocina MCP-1, maior será o risco de desenvolver distúrbios neurológicos associados com a SIDA ou com a infecção por VIH em geral ou o risco de desenvolver um estágio avançado de distúrbios neurológicos associados com a SIDA ou com a infecção por VIH em geral.

A presente invenção também tem por objecto um processo que compreende a quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1 (por exemplo, tal como descrito antes), numa amostra de líquido cefalorraquidiano e numa amostra de soro

de um indivíduo infectado com VIH, sendo realizadas ambas as quantificações no mesmo indivíduo e em amostras recolhidas ao mesmo tempo e, eventualmente, a quantificação da quimiocina IP-10 e/ou da quimiocina MCP-1, ambas numa amostra de líquido cefalorraquidiano e numa amostra de soro do mesmo indivíduo e sendo as referidas amostras colhidas ao mesmo tempo.

Este processo, com base na quantificação paralela dos anticorpos específicos para HMGB1 em duas amostras diferentes pode ser utilizado nas seguintes aplicações:

- um processo *in vitro* para monitorizar uma infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH) num indivíduo que se sabe que está infectado com VIH;
- um processo de prognóstico *in vitro* do estado de progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou do estado de progressão da SIDA de um doente infectado com VIH e, preferencialmente, durante uma infecção primária ou aguda ou durante uma infecção crónica; e
- um processo de prognóstico *in vitro* quer do estado de progressão de distúrbios neurológicos associados com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou com a infecção por VIH ou o estado de progressão de distúrbios neurológicos associados com a SIDA ou com a infecção por VIH de um doente infectado com VIH durante a infecção primária ou aguda ou durante a infecção crónica.

Por “ao mesmo tempo”, entende-se que as amostras são obtidas de um determinado doente, dentro de um período de tempo em que os sintomas clínicos, em particular os distúrbios neurológicos, o estágio da SIDA e/ou a carga viral

do soro ou do LCR dos referidos doentes infectados com VIH são semelhantes (estatisticamente não significativos) ou idênticos. Em particular, este período não excede (é inferior a) 6 meses, 3 meses, 1 mês ou duas semanas.

Em paralelo com cada um e todos os processos de prognóstico *in vitro*, o processo *in vitro* para avaliar a imunodeficiência, a monitorização *in vitro* do estado, o processo *in vitro* para determinar o nível de activação imunitária e o processo de quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1 numa amostra de líquido cefalorraquidiano e numa amostra de soro, tal como se descreveu antes, determina-se a carga viral de VIH utilizando um processo convencional (por exemplo, por RCP). A expressão "em paralelo" significa que os processos são desenvolvidos em amostras obtidas do mesmo doente e ao mesmo tempo.

É interessante notar que, quando a carga viral no soro e/ou a carga viral no LCR de um doente podem não ser detectáveis e revelam uma ausência da replicação do vírus VIH no sangue e/ou no SNC, a quantificação de uma grande quantidade de anticorpos específicos para HMGB1, possivelmente em conjunto com uma grande quantidade de quimiocina IP-10 e/ou de quimiocina MCP-1, revela que o vírus VIH se replica noutros compartimentos ou órgãos, tais como, o fígado, o cérebro ou o intestino. Isto pode explicar que os doentes infectados por VIH tratados têm uma carga viral de VIH baixa ou indetectável, de acordo com padrões conhecidos, não progridem para a SIDA embora apresentem distúrbios neurológicos. Esta observação justifica que, em paralelo com a determinação da carga viral no soro, possam ser implementados outros ensaios, tais como, a quantificação de anticorpos específicos para HMGB1, para ter em conta o facto

de que o vírus VIH infecta e mantém-se em vários órgãos e vários compartimentos.

Qualquer um dos processos *in vitro* descritos antes que envolva a quantificação de anticorpos específicos para HMGB1 pode ser realizado implementando um ensaio ELISA ou outros processos de detecção imunológica utilizando a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) ou os seus derivados revestidos num suporte sólido e, eventualmente, utilizando anticorpos secundários capazes de detectar os anticorpos específicos de HMGB1.

Quando se trata da quantificação da quimiocina IP-10 e/ou da quimiocina MCP-1, podem utilizar-se os ensaios ELISA ou quaisquer outros processos conhecidos na técnica.

Os requerentes também puseram em evidência que a própria proteína HMGB1 pode ser analisada numa amostra de líquido cefalorraquidiano.

Consequentemente, ainda outro aspecto da presente invenção envolve a detecção de um aumento da concentração de HMGB1 em amostras de líquido cefalorraquidiano de indivíduos infectados com VIH. Também se pode utilizar uma correlação positiva entre a carga viral e a concentração de HMGB1, numa amostra de líquido cefalorraquidiano, para monitorizar a infecção por VIH. A concentração de HMGB1 pode ser quantificada com ensaios de diagnóstico bem conhecidos, tais como os ensaios por ELISA. A HMGB1h recombinante, os anticorpos monoclonais anti-HMGB1h e o soro de coelho anti-HMGB1h estão comercialmente disponíveis e podem ser utilizados nesses ensaios de diagnóstico.

A presente invenção também tem por objecto um processo *in vitro* para a monitorização da infecção por VIH num indivíduo infectado com VIH, que compreende a quantificação da proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) contida numa amostra de líquido cefalorraquidiano obtida do referido indivíduo, em particular, fazendo contactar a amostra biológica do referido indivíduo infectado com VIH com anticorpos que se ligam imunologicamente à proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1), em que a proteína HMGB1 visada para a quantificação é quer a proteína total HMGB1 ou uma sua fracção circulante (HMGB1 circulante) ou a sua fracção complexada sob o ponto de vista imunológico.

A presente invenção também tem por objecto um processo *in vitro* para monitorizar a carga viral de VIH num indivíduo que se sabe que está infectado com VIH, que compreende a realização da quantificação da proteína HMGB1, numa amostra de líquido cefalorraquidiano obtida do referido indivíduo, em que quanto mais proteína HMGB1, maior a carga viral. Por "*carga viral*", entende-se quer o ARN de VIH (que deriva das partículas virais e está presente no plasma) quer o ADN de VIH (que está integrado no genoma celular e presente nas células). Numa modalidade particular, os processos da presente invenção, com base na quantificação de HMGB1, são apropriados para monitorizar a carga viral de ARN do VIH.

Os processos para monitorizar a infecção por VIH ou a carga viral podem ser implementados com base na codificação de HMGB1 circulante (residual), com base na quantificação de HMGB1 total ou com base na quantificação da fracção do complexo de HMGB1 imunológica/anticorpos específicos.

Numa modalidade particular, estes processos têm por base quer a quantificação da HMGB1 circulante ou da HMGB1 total.

Quando a quantificação tem por base a HMGB1 total, os processos da presente invenção também incluem uma etapa apropriada para a dissociação dos complexos imunológicos formados por anticorpos específicos da HMGB1 e, por exemplo, os processos da presente invenção utilizam ou incluem um tratamento com ácido da amostra de líquido cefalorraquidiano.

Um tratamento com ácido apropriado inclui o contacto da amostra de líquido cefalorraquidiano com uma solução de dissociação ácida com um baixo pH, preferencialmente um pH entre 1 e 3, escolhido para separar a proteína HMGB1 do anticorpo específico sem alterar a proteína HMGB1 e a sua capacidade de reconhecimento por anticorpos específicos. Numa modalidade particular, a solução de dissociação ácida é glicina (por exemplo, 1,5 M), a um pH baixo, preferencialmente, um pH entre 1 e 3 (por exemplo, 1,85). Pára-se então o tratamento ácido com um tampão de neutralização (tal como, Tris, por exemplo, Tris 1,5 M, a pH 9). Noutra modalidade preferida, em combinação ou não com a anterior, a incubação com a solução de dissociação ácida realiza-se a uma temperatura entre 20 e 37 °C, preferencialmente a 25 °C e/ou a etapa de neutralização tem lugar em gelo.

A quantificação da proteína HMGB1 pode ser comparada com a quantidade de HMGB1 de uma amostra de líquido cefalorraquidiano obtida de um indivíduo infectado com VIH ou com a quantidade de HMGB1 de uma amostra de líquido cefalorraquidiano, obtida do mesmo indivíduo, num momento diferente.

A presente invenção também tem objecto, para as mesmas aplicações, um processo que compreende a quantificação de HMGB1 (por exemplo, tal como descrito antes), numa amostra de

líquido cefalorraquidiano e numa amostra de soro de um indivíduo infectado com VIH, sendo ambas as quantificações realizadas no mesmo indivíduo e ao mesmo tempo e, eventualmente, a quantificação da quimiocina IP-10 e/ou da quimiocina MCP-1, ambas numa amostra de líquido cefalorraquidiano e numa amostra de soro do mesmo indivíduo e ao mesmo tempo.

Pode utilizar-se um estojo para implementar uma das seguintes aplicações: para monitorizar a infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH) de um indivíduo infectado com VIH, para monitorizar a carga viral de VIH de um indivíduo infectado com VIH, que não está sob tratamento para a infecção por VIH, para realizar o prognóstico quer do estado da progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou o estado de progressão para SIDA de um indivíduo infectado com VIH, para realizar o prognóstico quer do estado de progressão de distúrbios neurológicos associados com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou com a infecção por VIH ou o estado de progressão para distúrbios neurológicos associados com a SIDA de um doente infectado com VIH ou com uma infecção por VIH, para avaliar a imunodeficiência de um indivíduo infectado com VIH, para determinar o nível de activação imunitária, especialmente a activação imunitária persistente num indivíduo infectado com VIH e para monitorizar o estado do indivíduo infectado com VIH.

Este estojo inclui proteína HMGB1 natural ou os seus derivados, tal como foram definidos antes e uma solução de dissociação ácida, apropriada para dissociar complexos imunológicos de HMGB1/anticorpo anti-HMGB1 encontrados na amostra biológica, quando retiradas do doente, tal como definido antes e, eventualmente, significa quantificar a

quimiocina IP-10 e/ou significa quantificar a quimiocina MCP-1. Eventualmente, este estojo pode também conter um tampão de neutralização, por exemplo, tal como definido antes e/ou anticorpos secundários que se ligam e/ou que revelam a formação do complexo de HMGB1/anticorpos específicos.

O estojo é implementado para quantificar os anticorpos anti-HMGB1 de qualquer amostra biológica, em particular, de uma amostra de líquido cefalorraquidiano de um doente infectado com VIH ou de uma amostra de soro de um doente infectado com VIH ou, quando a quantificação paralela é necessária, tanto na amostra de líquido cefalorraquidiano como na amostra de soro do referido indivíduo infectado com VIH.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Detecção de HMGB1 e de anticorpos anti-HMGB1 no LCR de doentes infectados com VIH-1. A- Painel da esquerda. Quantificou-se a concentração de HMGB1 por ELISA (Shinotest, IBL), no LCR de 10 dadores saudáveis (DS) e 23 doentes infectados com VIH-1 com distúrbios neurológicos. Os gráficos de Box e Whisker representam a média $\pm$ DP da concentração de HMGB1 no LCR (limite de detecção 0,25 pg/mL), nos dois grupos [0,5 pg/mL (intervalo 0,25-1,47), em DS versus 1,67 pg/mL (intervalo 0,25-15,9) em doentes]. A- Painel da direita. Estratificaram-se doentes infectados com VIH desde o estágio 2 até ao estágio 4 de acordo com a gravidade do distúrbio neurológico, sendo o LCR obtido apenas de doentes no estágio 3 e no estágio 4. Detectou-se HMGB1 em concentrações crescentes no LCR de doentes no estágio 3 versus DS, mas, devido à variabilidade dos valores, as diferenças entre DS e doentes de ambos os grupos não foram significativas sob o ponto de vista estatístico. B- Painel da

esquerda. Quantificou-se a concentração de anticorpos anti-HMGB1 por ELISA no LCR de 10 dadores saudáveis (DS) e 23 doentes infectados com VIH-1 com distúrbios neurológicos. Os gráficos de Box e Whisker representam a média $\pm$ DP das concentrações de anti-HMGB1 no LCR (a média e os valores do intervalo estão indicados nas caixas). O valor de p das diferenças significativas está referenciado (teste de Mann-Whitney não paramétrico). B- Painel da direita. Analisou-se o LCR de doentes do estágio 3 (n=12) e do estágio 4 (n=11) quanto aos anticorpos anti-HMGB1 e comparou-se com os DS (n=10). Os gráficos de Box e Whisker representam a média $\pm$ DP das concentrações dos anticorpos anti-HMGB1. O valor de p das diferenças significativas está referenciado (teste de Mann-Whitney não paramétrico).

Figura 2: Impacto da carga viral nos níveis de HMGB1 e dos anticorpos anti-HMGB1 no LCR. A- Estratificaram-se os doentes em dois grupos de acordo com a carga viral (CV) no LCR: indetectável (isto é, < 40 cópias/mL) e positiva (CV > 40 cópias/mL). Os valores médios estão indicados em cada caixa. As concentrações de HMGB1 e de anti-HMGB1 foram comparadas entre estes dois grupos e referem-se os valores de p (teste de Mann-Whitney não paramétrico). B- Correlações de Spearman entre as concentrações no LCR quer de HMGB1 quer de anticorpos anti-HMGB1 e o log da CV no LCR. O coeficiente de correlação (r) e os valores de p estão relatados. C: Correlações de Spearman entre a CV no plasma e a concentração de HMGB1 no LCR (painel da esquerda) ou a CV no LCR (painel da direita). O coeficiente de correlação (r) e os valores de p estão relatados.

Figura 3: Correlação dos níveis dos anticorpos anti-HMGB1 no LCR com a evolução da doença. A- O número de células T CD4 periféricas está correlacionado com a evolução da

doença. Estratificaram-se os doentes em 3 grupos de acordo com o número de células T CD4 no sangue e compararam-se os níveis de HMGB1 e dos anticorpos anti-HMGB1 entre os 3 grupos. Os valores de p (teste de Mann-Whitney não paramétrico) estão relatados. B- Correlações de Spearman entre as concentrações no LCR quer de HMGB1 quer dos anticorpos anti-HMGB1 e o número de células T CD4. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados.

Figura 4: Correlação dos níveis de HMGB1 e dos anticorpos anti-HMGB1 no LCR com a activação imunitária. A- CV no LCR, Comparou-se a percentagem de células T CD8⁺ HLA-DR⁺ e células T CD8⁺ CD38⁺ entre os três grupos de doentes estratificados de acordo com o seu número de células T CD4. Os valores de p estão relatados (teste de Mann-Whitney não paramétrico). B- Correlações de Spearman entre a CV no LCR ou no soro e a % de células T CD8⁺ CD38⁺ ou células T CD8⁺ HLA-DR⁺. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados. C- Painel do topo: Correlações de Spearman entre os anticorpos anti-HMGB1 no LCR e a % de células T CD4⁺ HLA-DR⁺ ou as células T CD8⁺ HLA-DR⁺. Painel do fundo: Correlações de Spearman entre HMGB1 no LCR e a % de células T CD8⁺ HLA-DR⁺. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados.

Figura 5: Quantificação de 24 citocinas e quimiocinas no LCR de doentes no estágio 3 e no estágio 4. Quantificou-se um painel de 24 citocinas e quimiocinas por tecnologia MAP (Luminex) no LCR de DS, doentes no estágio 3 e no estágio 4. Os gráficos de Box e Whisker representam a média $\pm$ DP de um painel de quimiocinas. Detectou-se apenas IP-10 e MCP-1 em níveis significativos. Os valores de p estão relatados (teste

de Mann-Whitney não paramétrico) para comparações estatísticas entre doentes e DS.

Figura 6: Correlação dos níveis de IP-10 e MCP-1 no LCR com a carga viral no LCR e a evolução da doença. A- Correlações de Spearman entre IP-10 no LCR e a CV no LCR, % de células T CD8⁺ CD38⁺ e % de células T CD8⁺ HLA-DR⁺. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados. B,C- Correlações de Spearman entre MCP-1 no LCR e o número de células T CD4 no sangue, a % de células T CD8⁺ CD38⁺ (B) e IL-10 no LCR (C). Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados.

Figura 7: Correlação entre IP-10 no LCR e MCP-1 no LCR em doentes no estágio 3 e no estágio 4 e anticorpos anti-HMGB1. A- Concentrações comparativas de IP-10 (painel do topo) e MCP1 (painel do fundo) em doentes no estágio 3 no estágio 4 e DS. Os valores médios estão indicados no fundo da figura. Os valores de p estão relatados (teste de Mann-Whitney não paramétrico) para comparações estatísticas entre doentes e DS. B- Ilustram-se as correlações de Spearman entre anticorpos anti-HMGB1 no LCR e IP-10 no LCR ou MCP1 no LCR. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados.

Figura 8: Correlação dos níveis de anticorpos anti-HMGB1 no soro no estágio 2 com a CV no plasma. A- Concentrações comparativas de HMGB1 no soro (painel da esquerda) e anticorpos anti-HMGB1 (painel da direita) em doentes infectados com VIH no estágio 1 (n=33, sem distúrbio neurológico), estágio 2 (n=41, distúrbio neurológico ligeiro), estágio 3 (n=17) e estágio 4 (n=13). Os valores de p estão relatados (teste de Mann-Whitney não paramétrico), para comparação estatística entre os grupos de doentes. B- Os

doentes foram estratificados em 2 grupos de acordo com a CV no LCR: indetectável (isto é, < 40 cp/mL, $n=55$) e positivo ($CV < 40$ cp/mL, $n=28$). Comparou-se os anticorpos anti-HMGB1 e o número de células T CD4 entre estes 2 grupos e os valores de p estão relatados (teste de Mann-Whitney não paramétrico). C- Estratificaram-se os doentes de acordo com a CV, conforme indicado no eixo do x. As concentrações dos anticorpos anti-HMGB1 e de HMGB1 (painéis do topo esquerdo e do fundo) foram comparadas para cada grupo e os valores de p foram relatados (teste de Mann-Whitney não paramétrico). O painel do topo no lado direito mostra a correlação de Spearman entre anticorpos anti-HMGB1 e a CV do soro em 105 doentes. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados.

Figura 9: Correlação entre os níveis de anticorpo anti-HMGB1 no soro e IP-10. A- Correlações de Spearman entre os níveis de anticorpo anti-HMGB1 e IP-10 (painel da esquerda) ou HMGB1 (painel da direita) no soro de 106 doentes. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados. B- Correlações de Spearman entre IP-10 e o número de células T CD4 (painel da esquerda) ou a % de células T CD8⁺ HLA-DR⁺ (painel da direita) no soro de 105 e 86 doentes, respectivamente. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p estão relatados.

Figura 10: A supressão da CV com HAART está associada à redução de anticorpos anti-HMGB1, HMGB1, IP-10, MCP-1 no LCR e a activação imunitária. Estratificaram-se os doentes de acordo com o facto de terem recebido HAART ou não terem tido nenhuma terapia anti-retroviral. Os níveis médios da carga viral (CV), HMGB1, anticorpos (Ac) anti-HMGB1 (**A**), a percentagem de células CD8⁺ CD38⁺ e CD8⁺ HLA-DR⁺ (**B**) e os níveis de IP-10 e MCP1 (**C**) foram comparados entre os dois

grupos (teste de Mann-Whitney não paramétrico). Os valores de p estão relatados.

Figura 11: Persistência de HMGB1, anticorpos anti-HMGB1, IP-10 e MCP1 no LCR em doentes com a carga viral suprimida. Compararam-se os níveis de HMGB1, anticorpos anti-HMGB1, IP-10 e MCP1 no LCR em 66 doentes com CV < 40 cp/mL e 10 dadores saudáveis (DS). Estão indicados os valores médios (percentis de 25 %-75 %). As comparações estatísticas foram feitas com o teste de Mann-Whitney não paramétrico. Os valores de p estão relatados.

Figura 12: Os distúrbios neurológicos estão associados ao aumento dos níveis dos anticorpos anti-HMGB1 no soro em doentes com a CV suprimida. Os níveis de anticorpos (Ac) anti-HMGB1 e HMGB1 foram comparados entre estados neurológicos diferentes (**A**) ou entre doentes com DNAV (n=45) e doentes no estágio 1 (n=21) (**B**), todos eles apresentando uma CV < 40 cp/mL. Indicam-se os valores médios e fizeram-se as comparações estatísticas com o teste de Mann-Whitney não paramétrico. Os valores de p estão relatados.

C- As mesmas comparações que em **B** (estágio 1 versus doentes com DNAV) foi feita para os parâmetros indicados. Não se verificaram nenhuma diferença estatísticas para quaisquer destes parâmetros.

Figura 13: Correlações entre anticorpos anti-HMGB1, MCP1, IP-10 e a activação imunitária em doentes com DNAV e com a carga viral suprimida. A,B,C- As correlações de Spearman entre os parâmetros indicados nos soros de 45 doentes com VIH⁺ com DNAV e CV < 40 cp/mL. Reportam-se os coeficientes de correlação (r) e os valores de p.

EXEMPLOS

I. Detecção da proteína HMGB1 e dos anticorpos anti-HMGB1 em amostras (soro e/ou líquido cefalorraquidiano humano)

A concentração da proteína HMGB1 na amostra de doentes infectados com VIH foi quantificada de acordo com um estojo de ELISA com o teste de Shino (IBL).

Além disso, desenvolveu-se um ensaio específico de ELISA para a detecção dos anticorpos totais específicos anti-HMGB1. Utilizaram-se os seguintes reagentes:

- Anticorpos policlonais primários de coelho contra HMGB1 humana (Adcam ab18256) foram dirigidos contra um péptido sintético conjugado com KLH derivado dos resíduos 150 até ao terminal C da HMGB1 humana.
- A BOXB recombinante de HMGB1 (HMG Biotech HM-051) produzida em *E. Coli* de um plasmido de expressão que codifica para a sequência de mamífero que é totalmente idêntica nos seres humanos e nos murganhos.
- Soro de coelho de controlo (Sigma; Ref: R9133).
- IgG ou IgM anti-coelho conjugada com a fosfatase alcalina (PAL), comprimidos de substrato de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP).
- Calibradores: IgG humana de soro (Sigma; Ref: 12511) e IgM humana do soro (Sigma; Ref: 18260)
- O anticorpo de fosfatase alcalina (específico de Fc) IgG anti-humana, produzido em cabras (Sigma; Ref: A9544), anticorpo de fosfatase alcalina (específico da cadeia μ) IgM anti-humana, produzido em cabras (Sigma; Ref: A3437)

Realizou-se o ensaio de ELISA como se segue:

Realizou-se o revestimento de placas de 96 poços, durante a noite, a 4 °C, com 0,5 µg/mL de BOXB em DPBS. Simultaneamente realizou-se o revestimento de um calibrador com diluições em série em DPBS dos isótipos correspondentes (apenas para o ensaio de ELISA realizado com amostras humanas). Lavaram-se as placas, quatro vezes, com DPBS/Tween® 20 a 0,05 % (v/v), utilizando um lavador de microplacas (Atlantis; Oasys). Fizeram-se lavagens semelhantes depois de cada etapa do ensaio de ELISA. Bloquearam-se os sítios não ligados, a 4 °C, durante 2 horas, com SBF/ASB a 2 % (p/v). Adicionaram-se aliquotas de 100 µL da amostra diluída em DPBS/Tween® a 0,05 % (v/v)/ASB a 1 % (p/v), a poços revestidos e não revestidos e fez-se a sua incubação, durante 1 hora, a 37 °C. Todas as amostras que tinham sido ensaiadas tinham sido tratadas com glicina 1,5 M (v/v, a pH 1,85), durante 30 min, a 25 °C, num banho de água e depois mantiveram-se em gelo e diluíram-se com Tris 1,5 M (v/v), a pH 9,0. Diluíram-se imediatamente as amostras (de 1/10 a 1/1000) e distribuíram-se em placas revestidas. Adicionou-se anticorpos conjugados com fosfatase alcalina, IgG anti-coelho (proporção de 1/10 000) ou IgG anti-humana de cabra (proporção 1/2 000) ou anticorpos conjugados fosfatase alcalina IgM (proporção 1/2 000) diluídos com DPBS/Tween® a 0,05 % (v/v)/ASB a 1 % (p/v), durante 1 hora, a 37 °C. A detecção dos anticorpos específicos do antígeno foi realizada passados 30 min de incubação, a 37 °C, com 100 µL de substrato de pNPP e parou-se a reacção por meio da adição de 100 µL de NaOH 3 M. Calcularam-se as concentrações dos anticorpos específicos de BOXB de acordo com uma curva-padrão obtida a partir da absorvência de uma solução-padrão de imunoglobulina por meio do programa informático Ascent, ThermoElectrocorp,

como referido previamente num ensaio de ELISA específico de Shigella LPS (Launay et al., Vaccine 2009, 27: 1184-1191). Os dados estão expressos em µg/mL de anticorpos detectados.

II. Análise de HMGB1 e de anticorpos específicos anti-HMGB1, assim como, das assinaturas de quimiocina em LCR de doentes infectados com VIH

Doentes infectados com VIH

O grupo de doentes analisados, quanto ao teor de HMGB1 e de anticorpos anti-HMGB1 no LCR, faz parte do grupo de 105 doentes infectados cronicamente com VIH, classificados de acordo os distúrbios neurológicos associados à SIDA (como explicado antes). O grupo 1 inclui doentes infectados com VIH-1 sem distúrbios neurológicos, enquanto os grupos 2, 3 e 4 incluem doentes com distúrbios neurocognitivos crescentes.

IIa. Correlação de HMGB1 e de anticorpos específicos anti-HMGB1 com a carga viral, a evolução da doença e as assinaturas de quimiocina

Níveis aumentados de HMGB1 e de anticorpos anti-HMGB1 em amostras de LCR de doentes infectados com VIH (VIH⁺) quando comparados com dadores saudáveis

Utilizando o ensaio de ELISA Shinotest (IBL) para a detecção de HMGB1 (limite de detecção de 0,25 pg/mL) e o ensaio de ELISA feito na empresa para a detecção de anticorpos anti-HMGB1 (limite de detecção de 90 ng/mL), verificaram-se níveis aumentados tanto de HMGB1 (**fig. 1A**) como de anticorpos anti-HMGB1 (**fig. 1B**) no LCR de doentes (D) infectados com VIH comparados com dadores saudáveis (DS). O

nível aumentado de HMGB1 no LCR de doentes não era estatisticamente diferentes do dos DS (**fig. 1A**), em que os níveis de anticorpos anti-HMGB1 estavam significativamente aumentados comparados com os dos DS (**fig. 1B**). A estratificação dos doentes de acordo com o seu estágio neurológico mostrou que níveis aumentados tanto de HMGB1 como de anticorpos anti-HMGB1 no LCR foram observados para doentes nos estádios 3 e 4. Apenas os níveis de anticorpos anti-HMGB1 foram estatisticamente diferentes dos níveis dos DS (**fig. 1**).

HMGB1 e anticorpos anti-HMGB1 de amostras de LCR correlacionados com a carga viral

O VIH-1 é provavelmente o motor da produção de HMGB1 e de anticorpos anti-HMGB1 no LCR. Isto é sugerido pelo nível mais elevado tanto das moléculas em doentes com uma carga viral (CV) descontrolada, em comparação com doentes com CV indetectável (< 40 cp/mL no LCR) (**fig. 2A**). Além disso, verificou-se que os níveis de HMGB1 e dos anticorpos anti-HMGB1 estavam correlacionados positivamente com a CV de VIH-1 no LCR (**fig. 2B**). Como corolário (considerando que a CV no LCR está fortemente correlacionada com a CV no plasma, **fig. 2C**), o nível de HMGB1 no LCR estava positivamente correlacionado com a CV no plasma (**fig. 2C**).

Os níveis de anti-HMGB1 no LCR estão correlacionados com a evolução da doença

A marca da infecção por VIH é o desaparecimento progressivo das células T CD4 no sangue e o número de células T CD4 periféricas é o marcador da progressão da doença por VIH. A **fig. 3A** (painel da direita) mostra que o nível de anticorpos anti-HMGB1 no LCR aumenta quando o número de células T CD4 decresce e é significativamente mais elevado em

doentes com o número de células T CD4 baixo (< 300) versus os que têm um número alto (> 600). Além disso, o nível de anticorpos anti-HMGB1 no LCR parece estar correlacionado com a evolução da doença, assim como, os anticorpos anti-HMGB1 se correlacionam negativamente com o número de células T CD4 (**fig. 3B**, painel da direita). No que respeita aos níveis de HMGB1 no LCR, não variam com o número de células T CD4 (**fig. 3A, 3B**, painéis da esquerda). Deve notar-se que o ensaio que foi utilizado para a quantificação de HMGB1 (Shinotest, IBL) detecta apenas o HMGB1 livre residual (isto é, não detecta o HMGB1 complexado com anticorpos), enquanto o ensaio desenvolvido no laboratório da requerente para a quantificação do anticorpo anti-HMGB1 detecta todos os anticorpos, incluindo os que estão complexados com HMGB1. Assim, os níveis de anticorpos anti-HMGB1 (1000 vezes mais do que HMGB1) representam uma medida mais rigorosa da evolução da doença do que a HMGB1 residual.

Os níveis de HMGB1 e de anticorpo anti-HMGB1 no LCR estão associados com uma activação imunitária persistente

Um certo número de estudos têm vindo a demonstrar que a infecção crónica por VIH induz um estado de activação imunitária, que é um marcador forte da progressão da doença (Giorgi JV, et al., Shorter survival in advanced HIV-1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. J Infect Dis 1999). A activação imunitária pode ser analisada através da expressão de marcadores de activação em células T CD8 no sangue, em particular, CD38 e HLA-DR, cuja combinação está associada com o risco de progressão para a SIDA (Liu Z, et al., Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the

MACS Study than CD4⁺ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1997; 16: 83-92). A **fig. 4A** mostra que as percentagens de células T CD8⁺ CD38⁺ está significativamente aumentada em doentes com um número baixo de células T CD4⁺ (CD4 < 300/uL), em comparação com doentes que têm um elevado número dessas células (> 600/uL) e o estado de activação de células T (isto é, a percentagem de células T CD8⁺ CD38⁺ e células T CD8⁺ HLA-DR⁺) está correlacionado positivamente tanto com a carga viral do LCR como com a carga viral no plasma (**fig. 4B**). Nesse contexto deve notar-se que a expressão de HMGB1 e dos anticorpos anti-HMGB1 está correlacionada positivamente com o estado de activação das células T (**fig. 4C**).

Por isso, a detecção de HMGB1 e de anticorpos anti-HMGB1 no LCR de doentes com distúrbios neurológicos é a consequência da activação imunitária persistente pelo VIH.

Níveis aumentados de HMGB1 e de anticorpos anti-HMGB1 em amostras de LCR estão associados com níveis aumentados das quimiocinas inflamatórias IP-10 e MCP-1

Analizou-se o LCR de DS e de doentes com VIH⁺ com distúrbios neurológicos no estágio 3 ou no estágio 4, com a tecnologia MAP (do inglês MultiAnalyte Profiling, perfil de analitos múltiplos), para a detecção simultânea de 24 citocinas/quimiocinas. A **fig. 5** mostra a comparação dos perfis de quimiocinas no LCR de DS e de doentes com VIH⁺. No LCR de DS, as assinaturas de citocina/quimiocina foram caracterizadas pela detecção de duas quimiocinas, IP-10 e MCP-1. No LCR de doentes com VIH⁺, também se detectaram estas duas quimiocinas, mas em níveis mais elevados. A concentração aumentada de IP-10 no LCR de doentes estava correlacionada

com a CV no LCR (de acordo com o relatório anterior (Paola Cinquea et al. Cerebrospinal fluid interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) in VIH-1 infection. J Neuroimmunology 2005) e com o estado de activação das células T CD8 (**fig. 6A**). Do mesmo modo, concentrações aumentadas de MCP-1 estavam correlacionadas com o estado de activação de células T e os níveis de MCP-1 parecem estar correlacionados com a evolução da doença, conforme se mostra pela correlação inversa entre a concentração de MCP1 no LCR e o número de células T CD4 (**fig. 6B**). A **fig. 6C** mostra que os níveis de IP-10 e MCP-1 estão correlacionados positivamente no LCR de doentes.

Para caracterizar a natureza de mediadores detectados no LCR de doentes com distúrbios neurológicos, compararam-se os níveis de IP-10 e de MCP-1 entre DS e doentes no estágio 3 e no estágio 4. A **fig. 7A** mostra que o estágio 3 está associado com um aumento significativo tanto de IP-10 como de MCP-1. É interessante notar que as concentrações de IP-10 e de MCP-1 no LCR estavam associadas positivamente aos níveis de anticorpos anti-HMGB1 (**fig. 7B**).

IIb. HMGB1, os anticorpos anti-HMGB1 e as marcas de quimiocina no soro de doentes infectados com VIH⁺ com distúrbios neurológicos

Os níveis de anticorpos anti-HMGB1 no soro estão aumentados a partir do estágio 2 por causa da carga viral de VIH

A **fig. 8A** mostra que, a partir do estágio 2, os doentes exibem um aumento significativo dos níveis de anticorpo anti-HMGB1 no soro, enquanto os níveis de HMGB1 eram menos discriminatórios. Não houve diferenças significativas na CV entre os diferentes grupos (não mostrado). A estratificação

dos doentes com base na carga viral no soro (indetectável < 40 cp/mL versus positivo > 40 cp/mL) revelou que os anticorpos anti-HMGB1 estavam significativamente aumentados em doentes com uma carga viral detectável (**fig. 8B**). Como esperado, a CV detectável estava associada com um número reduzido de células T CD4 (**fig. 8B**). Uma estratificação mais refinada da CV no soro mostrou que os anticorpos anti-HMGB1 aumentam significativamente a partir de uma CV > 1000 cp/mL e os níveis de anticorpos contra HMGB1 estavam correlacionados positivamente com a CV (**fig. 8C**). Tal como observado no LCR, os níveis de HMGB1 eram menos discriminatórios.

Os níveis dos anticorpos anti-HMGB1 no soro estão correlacionados com as concentrações de IP-10

Tal como observado no LCR dos doentes, verificou-se uma correlação positiva entre os anticorpos anti-HMGB1 e os níveis de IP-10 (**fig. 9A**). Verificou-se que IP-10 estava correlacionada com a evolução da doença, dado que aumenta com a perda de CD4 e a sua produção está associada a uma activação persistente do sistema imunitário, conforme avaliado pela expressão de marcadores de activação de células T (**fig. 9B**). É interessante notar que os níveis de HMGB1 e os anticorpos anti-HMGB1 estavam inversamente correlacionados (**fig. 9A**), o que sugere que a produção de anticorpos anti-HMGB1 é orientada pela produção HMGB1 e que os anticorpos anti-HMGB1 têm uma actividade de neutralização.

IIc. Distúrbios neurológicos em doentes com a carga viral suprimida estão associados à persistência de anticorpos anti-HMGB1 e a quimiocinas IP-10 e MCP-1 no LCR e no soro

A supressão da carga viral (CV) com HAART está associada à redução de anticorpos anti-HMGB1, HMGB1, IP-10, MCP-1 no

LCR e à activação imunitária. As terapias anti-retrovirais com sucesso estão associadas à supressão da carga viral no LCR na maior parte dos doentes com distúrbios neurológicos (**fig. 10A**). Concomitantemente, os níveis de HMGB1, anticorpos anti-HMGB1 (**fig. 10A**), IP-10 e MCP1 (**fig. 10C**) no LCR estão reduzidos e a expressão de células T CD38 e HLA-DR em células T CD8 também está reduzida (**fig. 10B**).

Persistência de HMGB1, anticorpos anti-HMGB1, IP-10 e MCP1 no LCR de pacientes com a carga viral suprimida em comparação com doadores saudáveis. A comparação dos níveis de citocina/quimiocina no LCR de doentes com VIH⁺ com CV <40 cp/mL no LCR de doadores saudáveis revelou a persistência de HMGB1, anticorpos anti-HMGB1, IP-10 e MCP-1 (**fig. 11**). Assim, estes dados mostram que os distúrbios neurológicos que persistem apesar da supressão da CV estão associados com níveis elevados de anticorpos anti-HMGB1 e moléculas de IP-10 e MCP1 no LCR.

Os anticorpos anti-HMGB1 no soro distinguem doentes com distúrbios neurológicos associados a VIH (DNAV) de doentes no estágio 1, apesar da supressão da replicação viral. Verificou-se que os anticorpos anti-HMGB1 ainda aumentam significativamente em doentes com VIH⁺ com DNAV em comparação com doentes com VIH⁺ no estágio 1 (sem problemas neurológicos), apesar de todos estes doentes terem níveis de CV indetectáveis (<40 cp/mL) (**fig. 12A**). As **fig. 12B e 12C** mostram que os níveis de anticorpos anti-HMGB1 representam o único factor que distingue doentes com DNAV daqueles que não os têm. Não se verificou qualquer diferença nos níveis de HMGB1, IP-10 ou MCP-1, nem nas células T nCD4, células T nCD8, CD4 Nadir, nem nas percentagens de células T CD4 e CD8 activadas, em pacientes com DNAV versus pacientes sem esses distúrbios.

Correlações entre anticorpos anti-HMGB1, MCP1, IP-10 e activação imunitária em doentes com DNAV e carga viral suprimida.

Para entender as causas dos níveis persistentes de anticorpos anti-HMGB1, apesar da carga viral controlada, analisaram-se as correlações de Spearman entre vários parâmetros associados com a evolução clínica. A **fig. 13A** mostra que os níveis dos anticorpos anti-HMGB1 estão relacionados positivamente com os níveis de IP-10 e de MCP-1, estando eles próprios relacionados com o estado de activação imunitária, medida pela expressão de HLA-DR e CD38 em células T CD4 e CD8 (**fig. 13B**). Como já se tinha observado no grupo total (discutido antes), o estado de activação imunitária está correlacionado com a evolução da doença medida pelo número de células T CD4 (**fig. 13C**). Em geral, estes dados mostram que se detecta uma activação imunitária persistente em doentes com a carga viral suprimida e DNAV, o que origina a produção de anticorpos anti-HMGB1. A correlação negativa entre anticorpos anti-HMGB1 e HMGB1 no soro encontrada tanto no grupo completo de doentes (estádio 1 a estágio 4 com uma carga viral variável) (**fig. 9A**) como em doentes com DNAV e carga viral suprimida (**fig. 13A**), sugere uma actividade de neutralização *in vivo* por parte dos anticorpos.

CONCLUSÃO

Esta análise detalhada de mediadores solúveis detectados no soro e no LCR de doentes infectados com VIH, alguns deles sofrendo de distúrbios neurológicos associados com a SIDA, mostrou, no LCR, um perfil de inflamação caracterizado por níveis importantes de anticorpos anti-HMGB1 (em reacção à HMGB1 libertada) associados com uma elevada expressão da quimiocina IP-10. As quimiocinas têm sido implicadas na

imuno-patogénese de distúrbios neurológicos, tal como esclerose múltipla (EM) e, em particular, tem sido relatado um aumento de IP-10 no LCR de doentes com EM quando a inflamação é proeminente (Scarpini E et al. J Neurological Sciences 195: 41, 2002). Em doentes infectados com VIH, um estudo relatou que os níveis de IP-10 estavam aumentados nos indivíduos com infecções primárias e assintomáticas por VIH e com complexos de demência de SIDA e estavam correlacionados positivamente com a carga viral no LCR (Paola Cinquea et al. Cerebrospinal fluid interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) in VIH-1 infection. J Neuroimmunology 2005). A IP-10 é um agente de quimio-atracção potente e tem sido sugerido que aumenta a infecção de retrovírus e medeia lesões dos neurónios. As propriedades pró-inflamatórias de MCP1 e a sua capacidade para sobre-regular a replicação de VIH-1 também tem sido sugerida como contribuindo para o desenvolvimento de um risco acrescido de demência. A MCP-1 pode facilitar a migração de monócitos infectados e/ou activados para o cérebro, onde se tornam células hospedeiras para a replicação de VIH-1 e pode facilitar a activação de macrófagos, microglia e astrócitos o que resulta na libertação de um certo número de neurotoxinas potentes (Dhillon et al. Roles of MCP-1 in development of VIH-dementia. Front Biosci. 2008, 13: 3913-3918). As observações da requerente trazem novas verificações que demonstram que a HMGB1 de alarmina e, o que é mais importante, os anticorpos específicos para esta alarmina, são detectados (para além da IP-10 e da MCP-1) no LCR de doentes infectados com VIH com DNAV o que representa uma correlação de replicação viral e da evolução da doença. Além disso, a persistência dos anticorpos anti-HMGB1 em doentes com uma replicação viral suprimida é uma determinação de DNAV.

Estes resultados sugerem que a combinação de HMGB1/anticorpos anti-HMGB1, IP-10, MCP-1, é uma resposta e ao mesmo tempo é uma contribuição determinante da infecção local no CNS e a marca molecular dos anticorpos anti-HMGB1, IP-10 e MCP-1 pode ser útil no diagnóstico e prognóstico do complexo de demência da SIDA.

Lisboa, 29 de Julho de 2013.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo *in vitro*, para a quantificação de anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) contida numa amostra de líquido cefalorraquidiano obtida de um indivíduo, caracterizado pelo facto de compreender:
 - a) o contacto da referida amostra de líquido cefalorraquidiano com a proteína natural HMGB1 ou derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem a anticorpos específicos para HMGB1; e
 - b) a quantificação de anticorpos específicos para HMGB1.
2. Processo, *in vitro*, para a monitorização de uma infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH) de um indivíduo que se sabe estar infectado por VIH, caracterizado pelo facto de compreender a realização do processo tal como definido na reivindicação 1, em que, antes do contacto da amostra de líquido cefalorraquidiano com a proteína HMGB1 natural ou com derivados da proteína HMGB1, esses derivados se ligam aos anticorpos específicos para HMGB1, se realiza uma etapa de tratamento da amostra do líquido cefalorraquidiano por meio de um tratamento ácido para dissociar os complexos imunitários encontrados na amostra, preferencialmente com glicina 1,5 M, a um pH baixo e em que o referido processo, a quantificação dos anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) de uma amostra do líquido cefalorraquidiano obtida do referido indivíduo, é uma

quantificação total dos anticorpos específicos para HMGB1.

3. Processo, *in vitro*, para a monitorização de uma infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH) de um indivíduo que se sabe estar infectado com VIH, caracterizado pelo facto de compreender a quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1 a partir de uma amostra de líquido cefalorraquidiano obtida do referido indivíduo, por um processo tal como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo facto de os referidos anticorpos serem uma fracção em circulação (anticorpos em circulação) ou uma sua fracção complexada sob o ponto de vista imunológico.
4. Processo de prognóstico, *in vitro*, quer do estado de progressão da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) ou do estado de progressão para a SIDA, de um doente infectado com VIH, caracterizado pelo facto de compreender:
 - a) o contacto de uma amostra, em particular, uma amostra de soro ou de líquido cefalorraquidiano ou ambas as amostras de soro e de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente após a infecção e, preferencialmente, durante a infecção primária ou aguda ou durante a infecção crónica, com a proteína HMGB1 natural ou com derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem aos anticorpos específicos para HMGB1; e
 - b) a quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1;

caracterizado pelo facto de quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1, maior será o risco de desenvolver SIDA ou um estado avançado de SIDA.

5. Processo de prognóstico, *in vitro*, quer do estado de progressão de distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH, quer do estado de progressão de distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH, de um doente infectado com VIH, caracterizado pelo facto de compreender:

- a) o contacto de uma amostra, em particular, uma amostra de soro ou de líquido cefalorraquidiano ou ambas as amostras de soro e de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente após a infecção e, preferencialmente, durante a infecção primária ou aguda ou durante a infecção crónica com a proteína HMGB1 natural ou derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem aos anticorpos específicos para HMGB1; e
- b) a quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1;

caracterizado pelo facto de quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1, maior será o risco de desenvolver distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH ou de desenvolver um estado avançado de distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH.

6. Processo, *in vitro*, para a avaliação da imunodeficiência de um indivíduo que se sabe que está infectado com VIH, caracterizado pelo facto de compreender:

- a) o contacto de uma amostra, em particular, uma amostra de soro ou de líquido cefalorraquidiano ou ambas as amostras de soro e de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente após a infecção com a proteína HMGB1 natural ou derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem aos anticorpos específicos para HMGB1; e
- b) a quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1;

caracterizado pelo facto de quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1, maior será a imunodeficiência.

7. Processo, *in vitro*, para a determinação do nível de activação imunitária de um indivíduo que se sabe que está infectado com VIH, caracterizado pelo facto de compreender:

- a) o contacto de uma amostra, em particular, uma amostra de soro ou de líquido cefalorraquidiano ou ambas as amostras de soro e de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente após a infecção com a proteína HMGB1 natural ou derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem aos anticorpos específicos para HMGB1; e
- b) a quantificação dos anticorpos específicos para HMGB1;

caracterizado pelo facto de quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1, mais persistente será a activação imunitária.

8. Processo *in vitro*, de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 7, caracterizado pelo facto de compreender ainda a quantificação de outras moléculas encontradas no líquido cefalorraquidiano, tais como, quimiocinas e, preferencialmente, a quantificação da quimiocina IP-10 e/ou da quimiocina MCP-1.
9. Processo *in vitro*, para a monitorização do estado de um indivíduo que se sabe que está infectado com VIH, compreendendo a quantificação, em particular, numa amostra de soro ou numa amostra de líquido cefalorraquidiano ou tanto numa amostra de soro como numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente, após infecção, caracterizado pelo facto de compreender:
 - a) os anticorpos específicos para a proteína 1 de elevada mobilidade (HMGB1), por um processo que compreende o contacto das referidas amostras com a proteína HMGB1 natural ou derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem a anticorpos específicos para HMGB1; e
 - b) a quimiocina IP-10 e/ou a quimiocina MCP-1.
10. Processo de prognóstico *in vitro*, quer do estado de progressão de distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH ou o estado de progressão para distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH de um doente infectado com VIH, compreendendo a quantificação numa amostra, em particular, numa amostra de soro ou numa amostra de líquido cefalorraquidiano ou tanto numa amostra de soro como numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtidas do referido doente, após infecção, caracterizado pelo facto de compreender:

- a) os anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1), por um processo que compreende o contacto das referidas amostras com a proteína HMGB1 natural ou derivados da proteína HMGB1 desde que estes derivados se liguem a anticorpos específicos para HMGB1; e
- b) a quimiocina IP-10 e/ou a quimiocina MCP-1,

em que, quanto maior for o nível de anticorpos específicos para HMGB1 e maiores forem os níveis da quimiocina IP-10 e/ou de quimiocina MCP-1, maior será o risco de desenvolver distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH ou de desenvolver um estado avançado de distúrbios neurológicos associados com a infecção por VIH.

- 11. Processo, de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 10, caracterizado pelo facto de compreender ainda, antes do contacto da referida amostra, com a proteína HMGB1 natural ou com derivados da proteína HMGB1, desde que estes derivados se liguem aos anticorpos específicos para HMGB1, compreender uma etapa de tratamento da referida amostra por meio de um tratamento ácido para dissociar os complexos imunitários encontrados na amostra, preferencialmente, com glicina 1,5 M, a um pH baixo e em que, no referido processo, a quantificação diz respeito ao total de anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1).
- 12. Processo, de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 10, caracterizado pelo facto de, no referido processo, a quantificação dizer respeito à fracção em circulação (anticorpos em circulação) ou à fracção complexada, sob o ponto de vista imunológico, dos

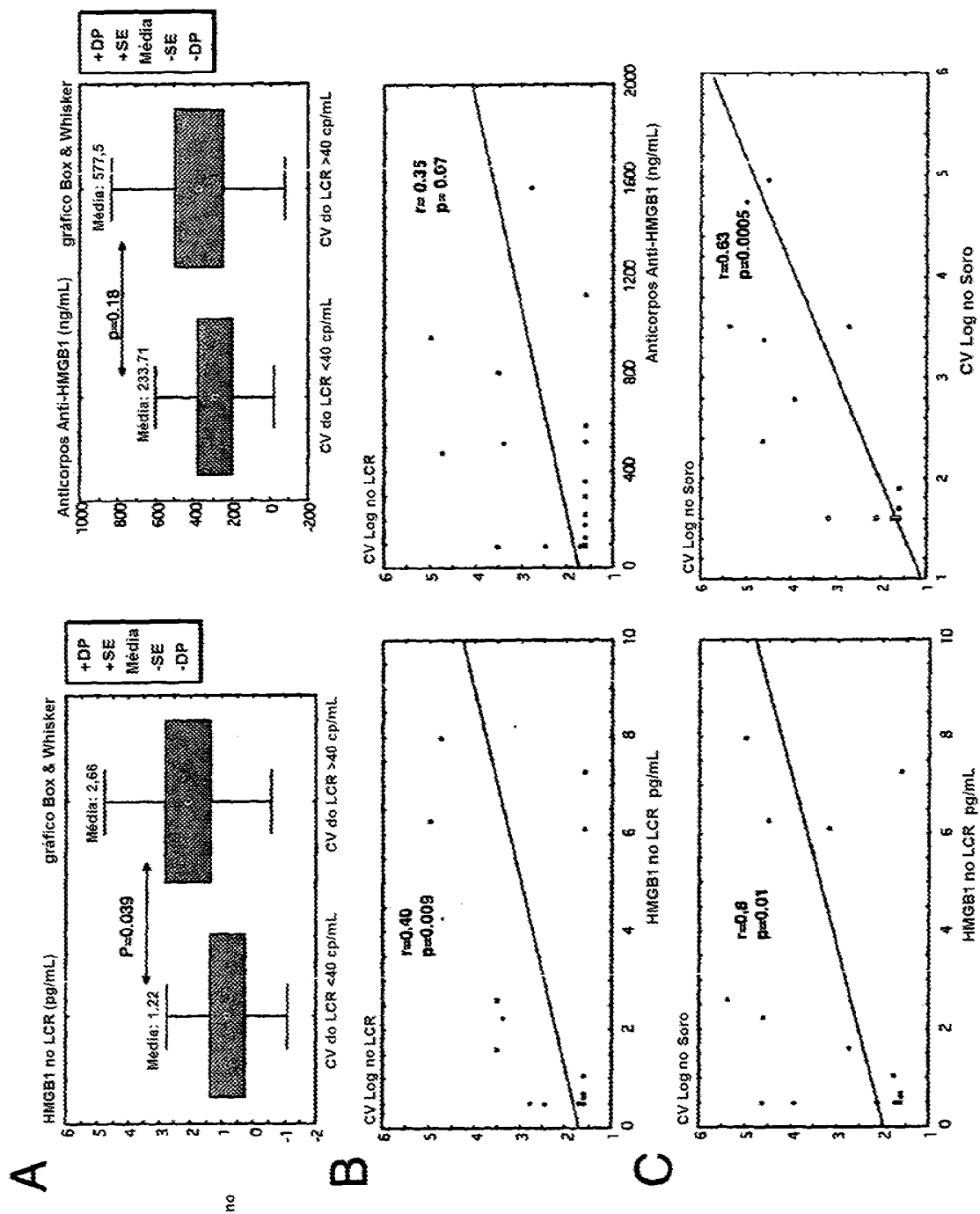
anticorpos específicos para a proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1).

13. Processo, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo facto de o derivado da proteína HMGB1 se seleccionar no grupo que consiste em HMGB1 recombinante, uma parte reactiva sob o ponto de vista imunológico de HMGB1, uma parte reactiva sob o ponto de vista imunológico de HMGB1 cuja sequência é comum às proteínas HMGB1 de várias origens e a BOXB recombinante de HMGB1 correspondente à sequência de HMGB1 comum a seres humanos e a murganhos.
14. Processo, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo facto de compreender ainda a determinação da carga viral no referido indivíduo ou doente.
15. Processo *in vitro*, para monitorizar a infecção por VIH, num indivíduo infectado com VIH, caracterizado pelo facto de compreender a quantificação da proteína 1 do grupo de elevada mobilidade (HMGB1) contida numa amostra de líquido cefalorraquidiano, obtida do referido indivíduo, em que a referida proteína HMGB1 visada para a quantificação é quer HMGB1 total, quer uma sua fracção circulante (HMGB1 em circulação) ou uma sua fracção complexada sob o ponto de vista imunológico.
16. Processo *in vitro*, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de a referida HMGB1 quantificada ser comparada com a quantidade de HMGB1 de uma amostra de líquido cefalorraquidiano obtida de um indivíduo não infectado com VIH ou com a quantidade de

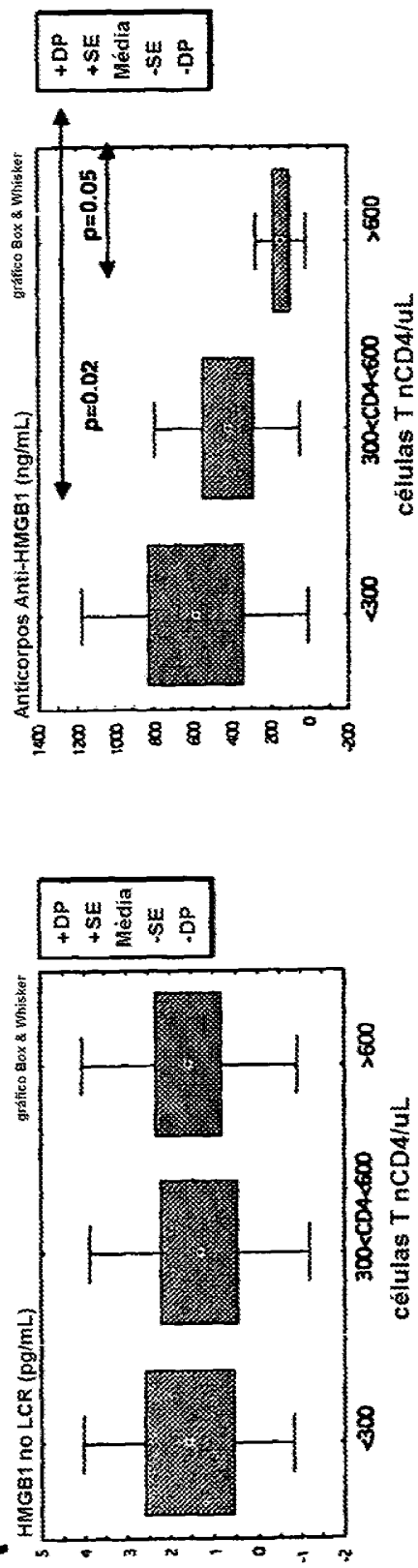
HMGB1 de uma amostra de líquido cefalorraquidiano obtida do mesmo indivíduo num momento diferente.

17. Processo *in vitro*, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de o referido VIH ser VIH-1 ou VIH-2.

Lisboa, 29 de Julho de 2013.



A



B

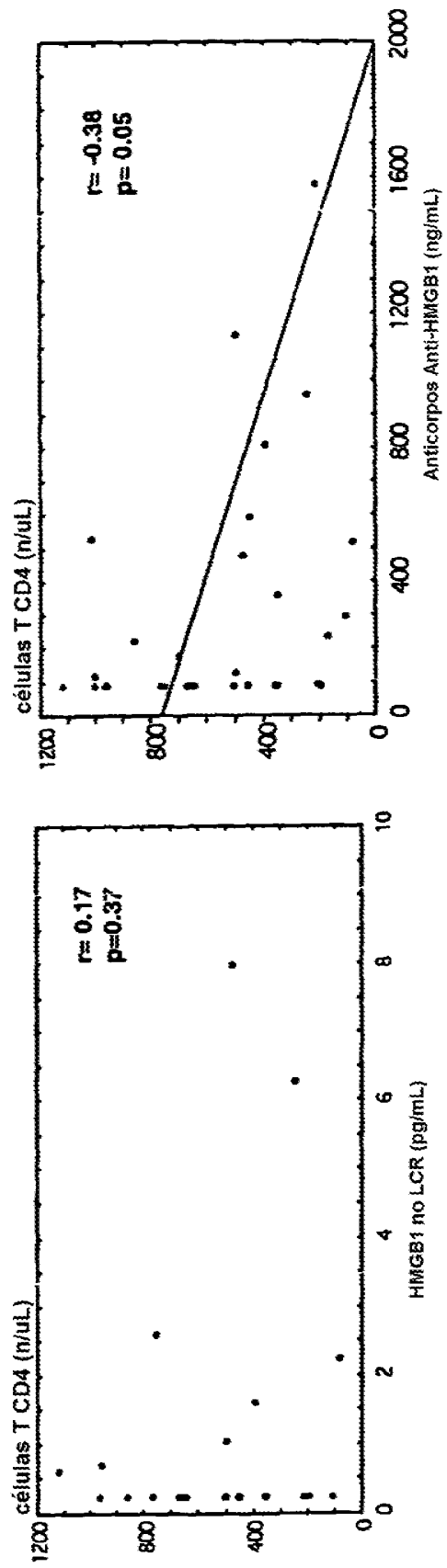


Fig. 3

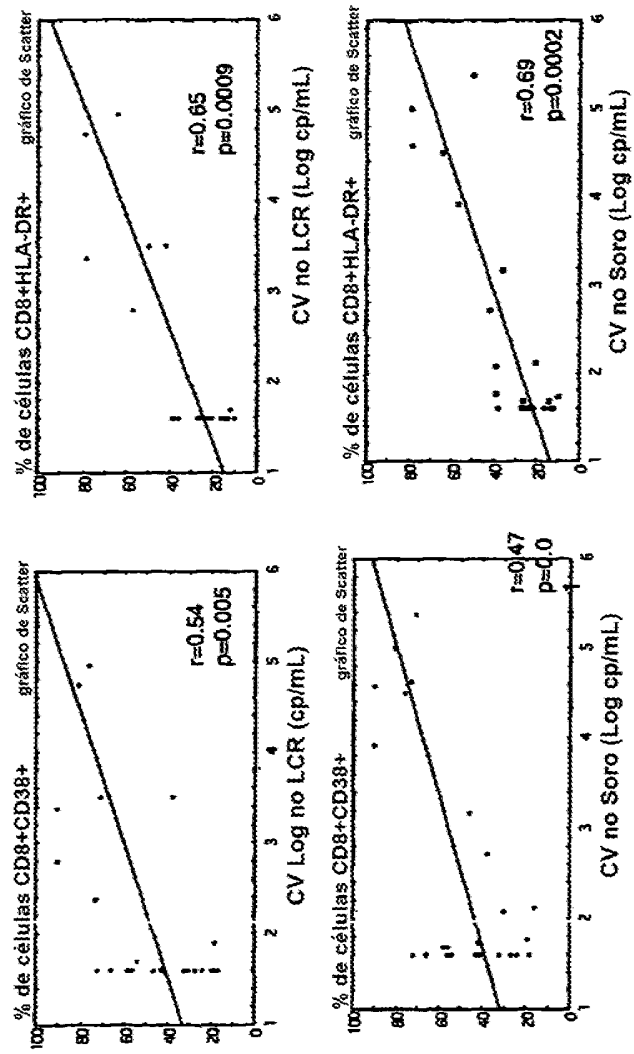
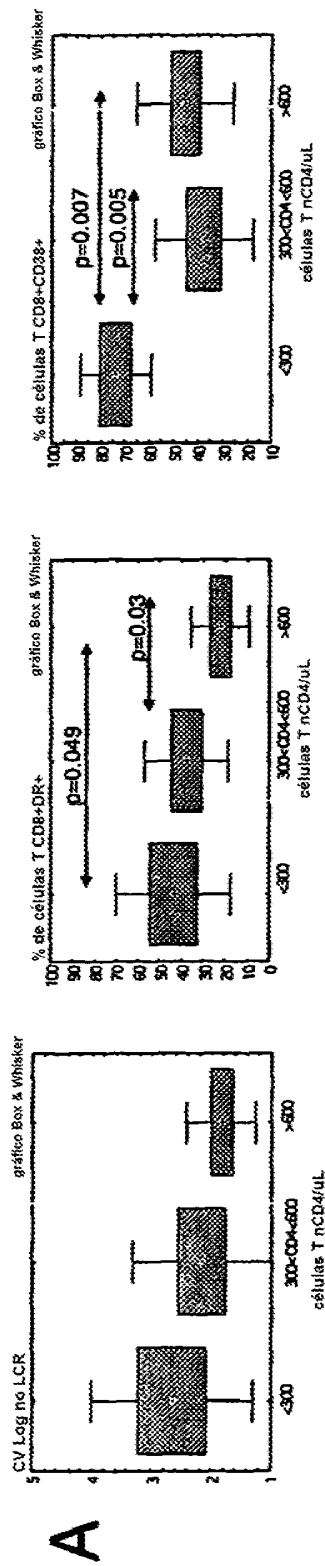


Fig. 4A

C

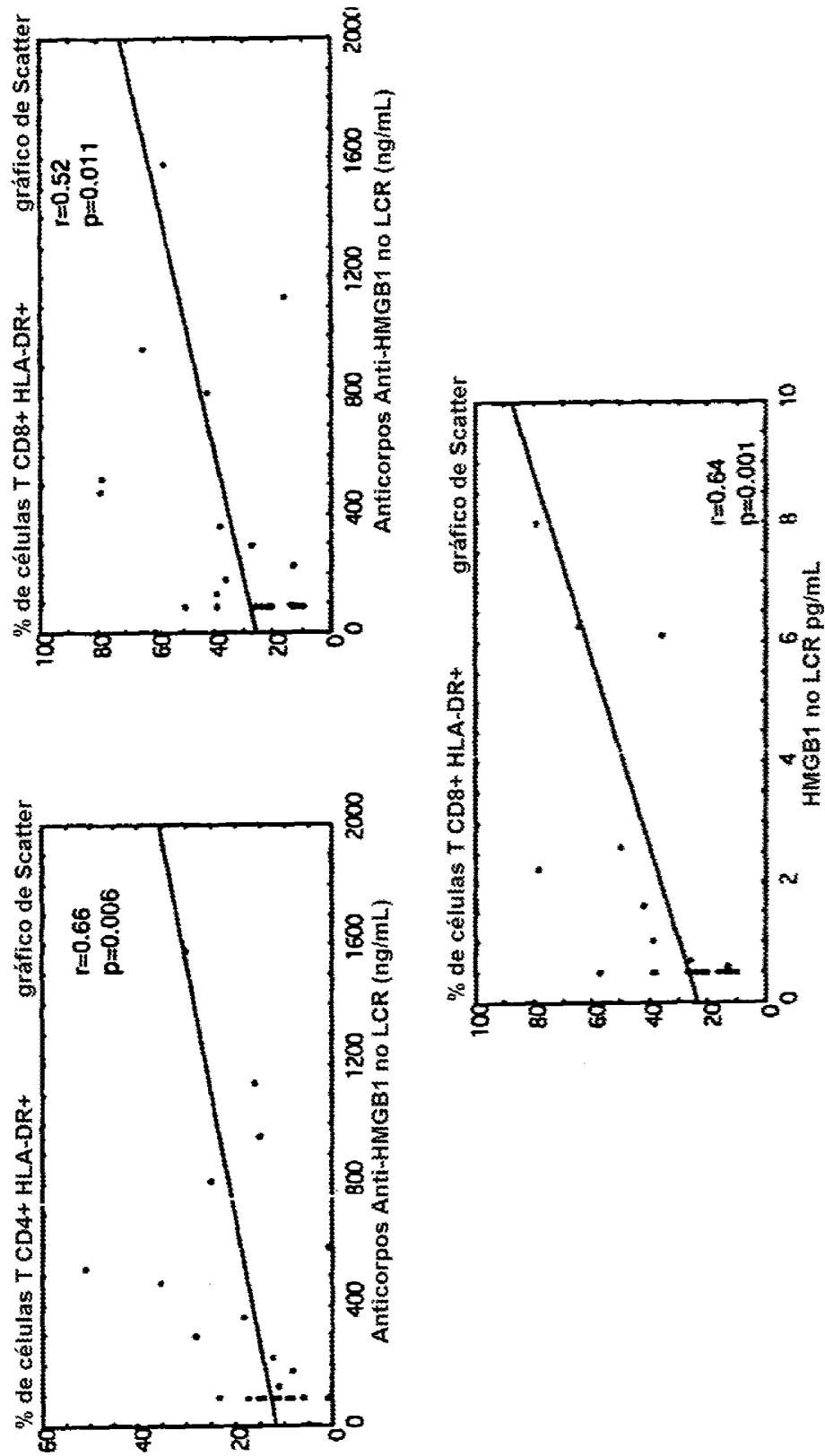


Fig. 4B

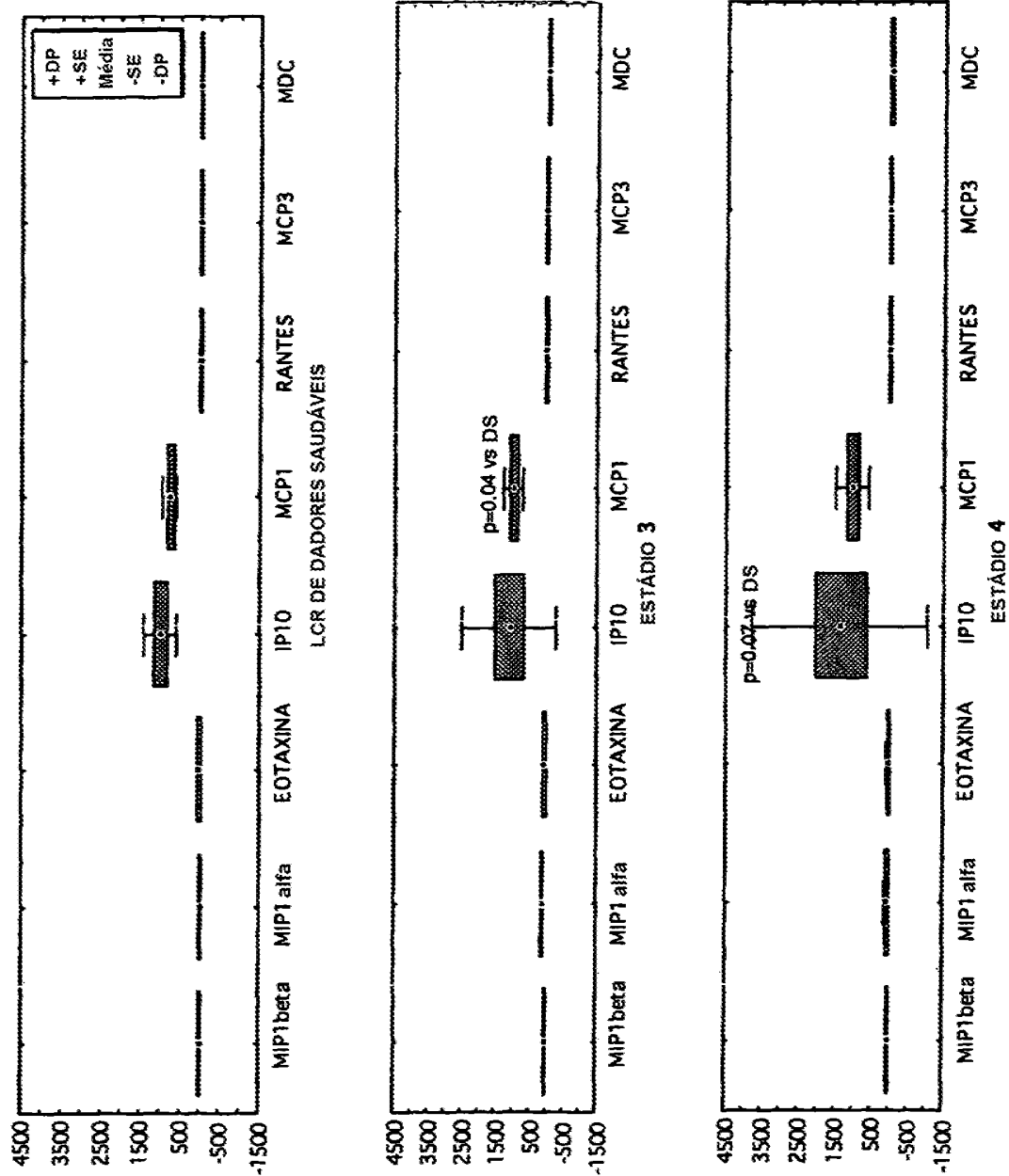


Fig. 5

A

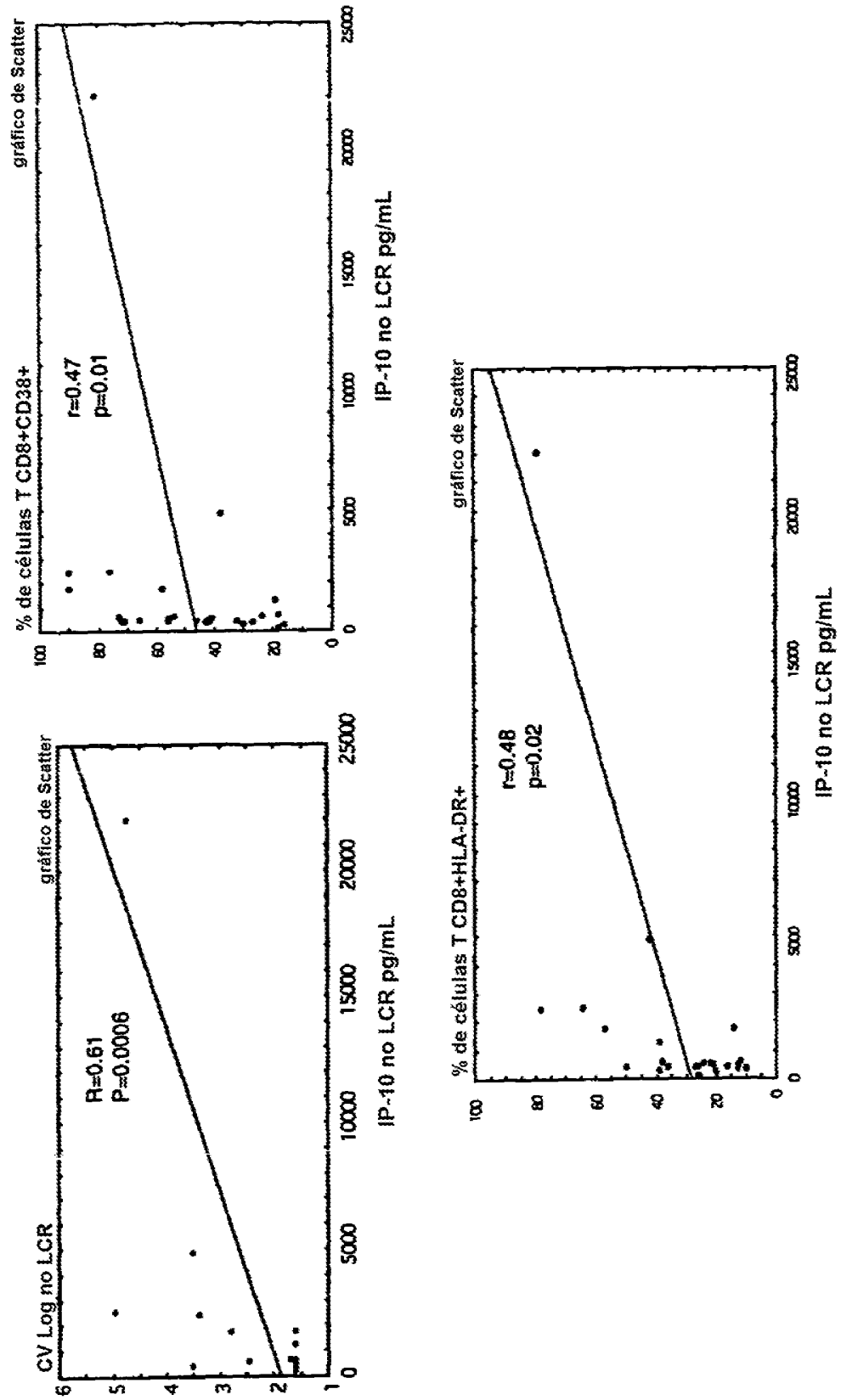
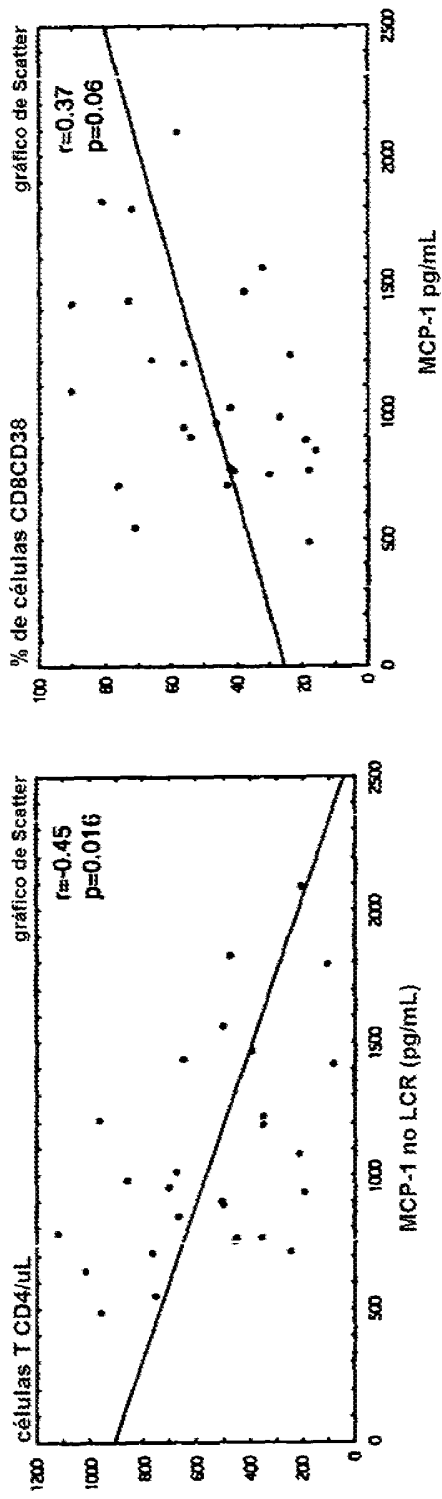


Fig. 6A

B



C

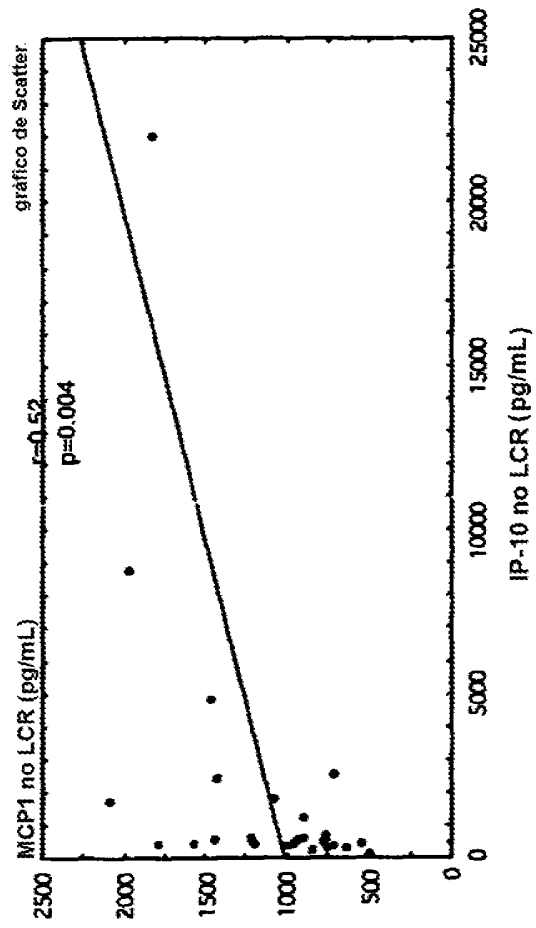


Fig. 6B

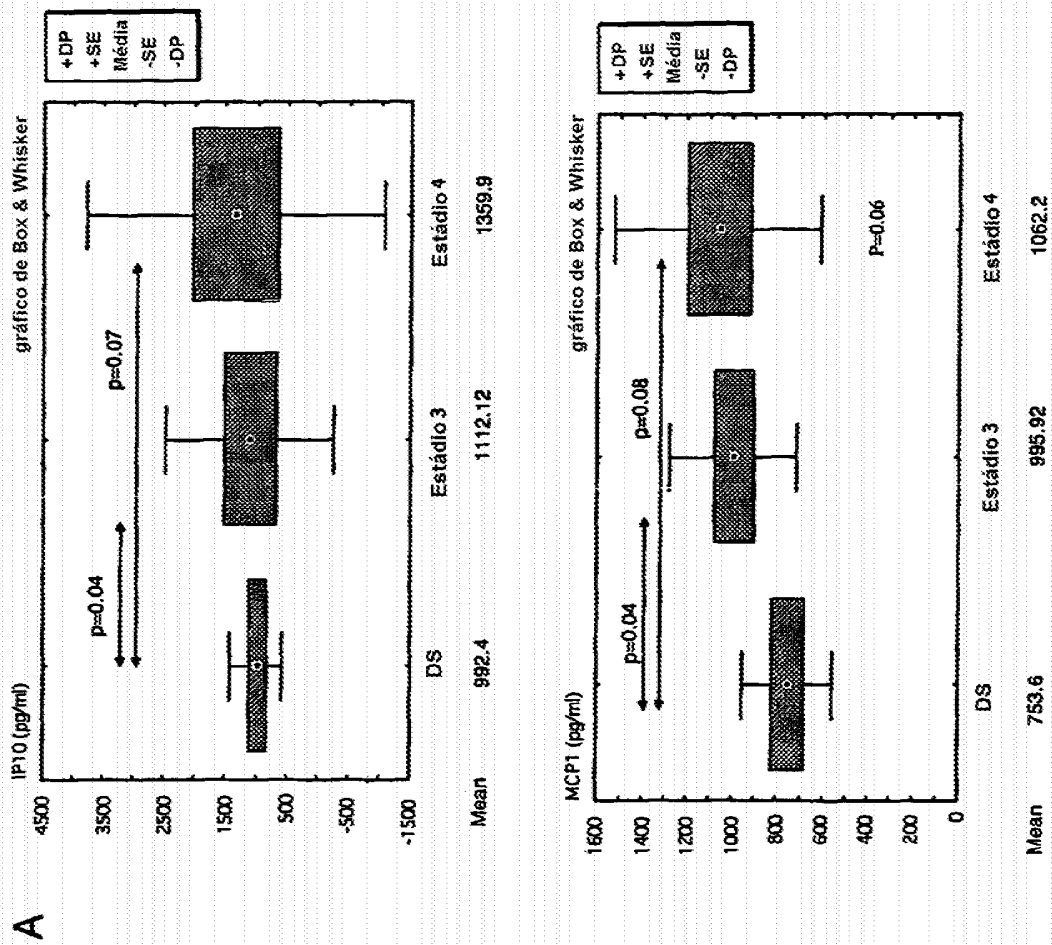
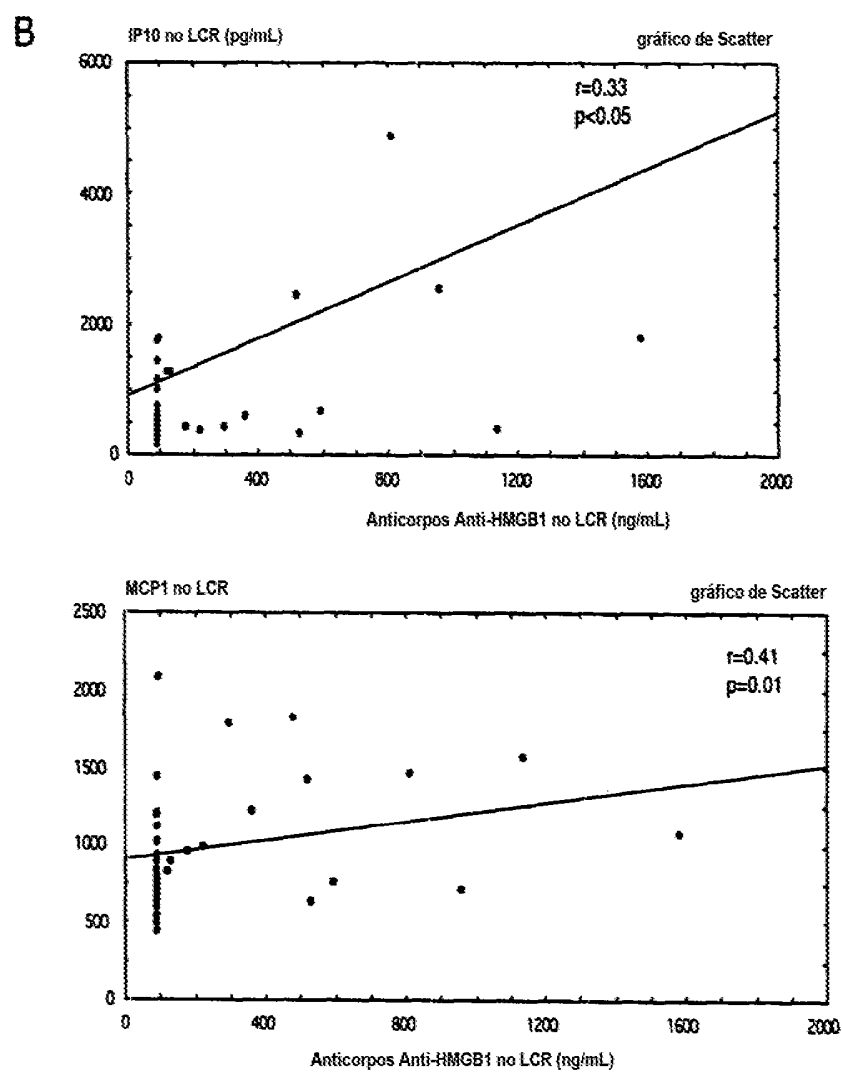


Fig. 7A

Fig. 7B



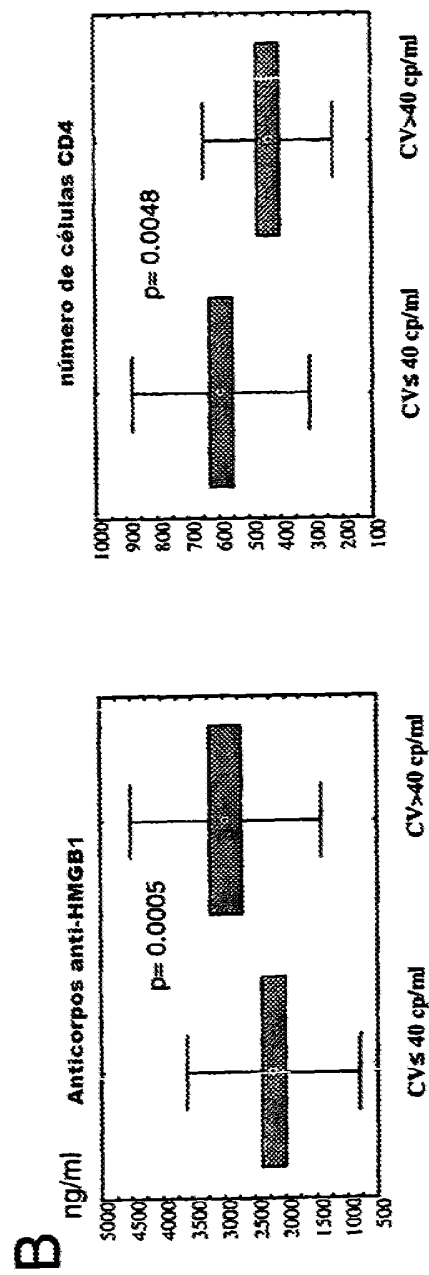
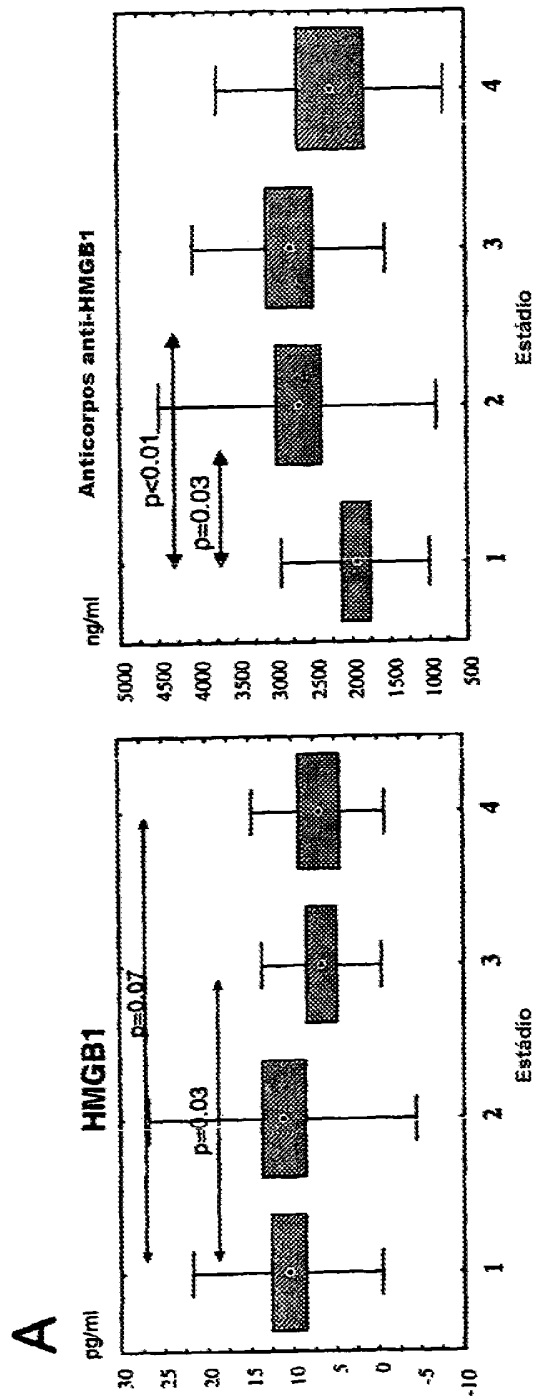


Fig. 8A

C

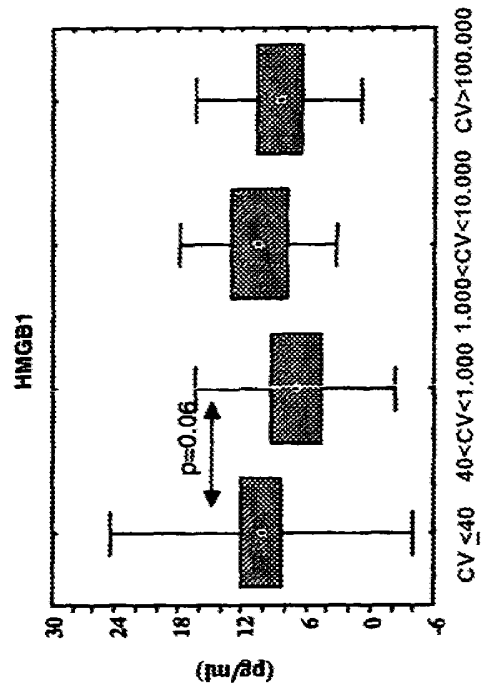
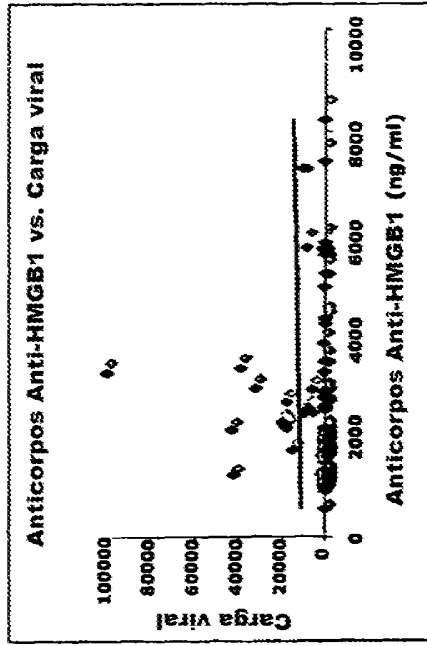
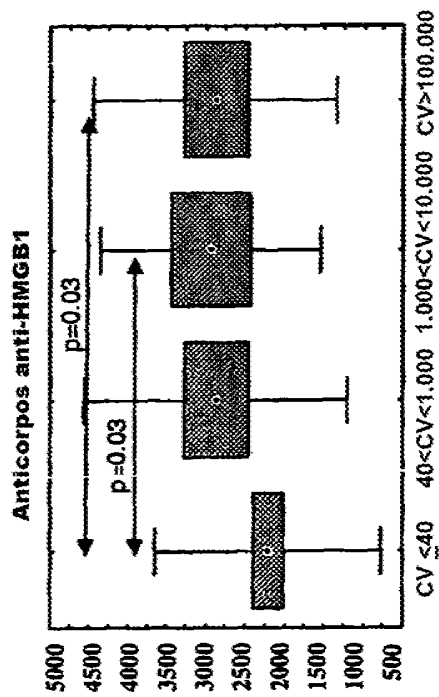
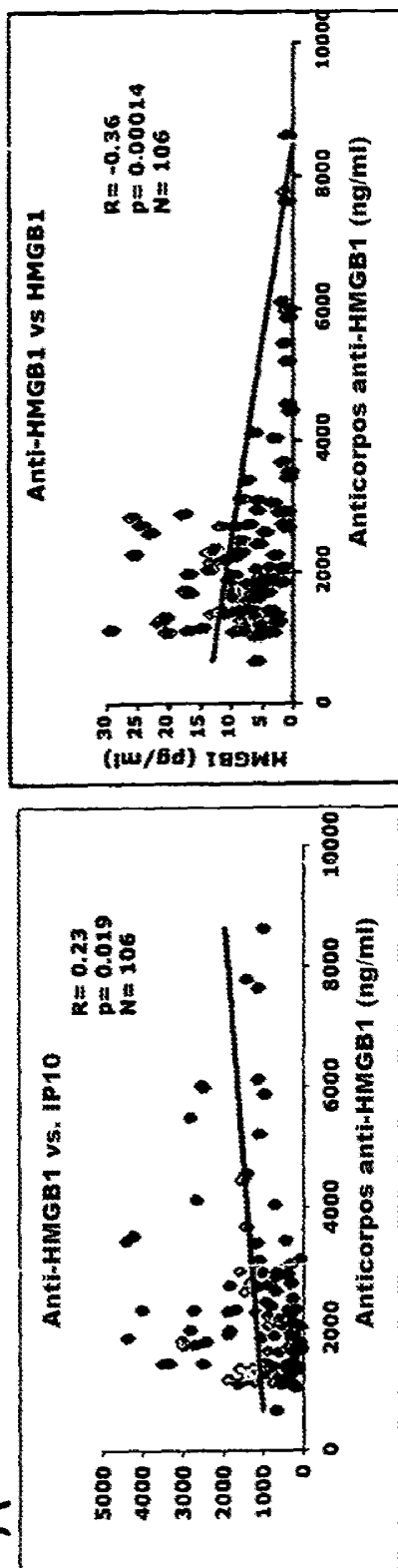


Fig. 8B

A



B

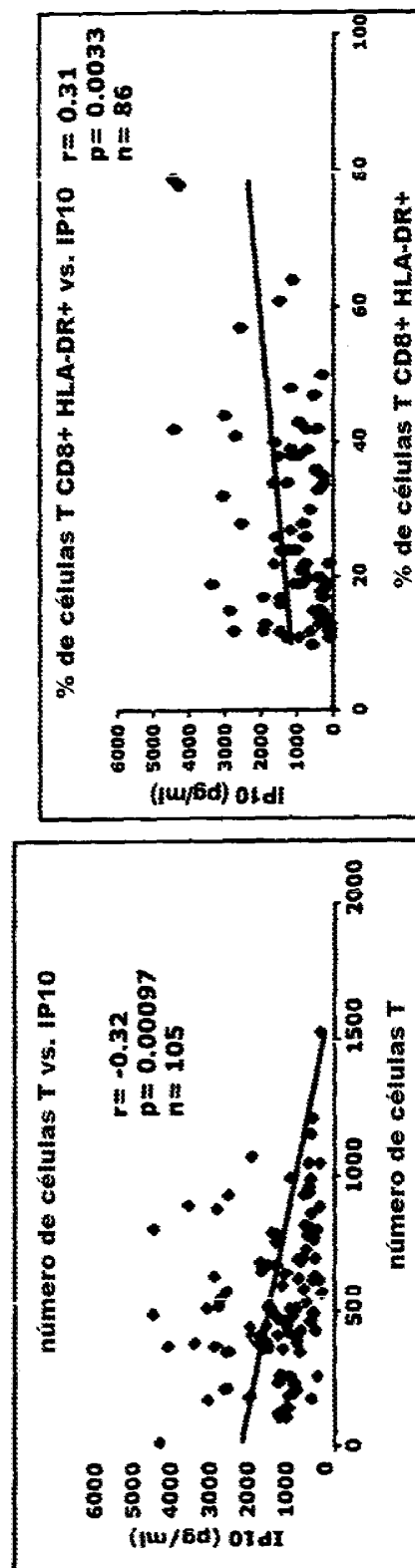
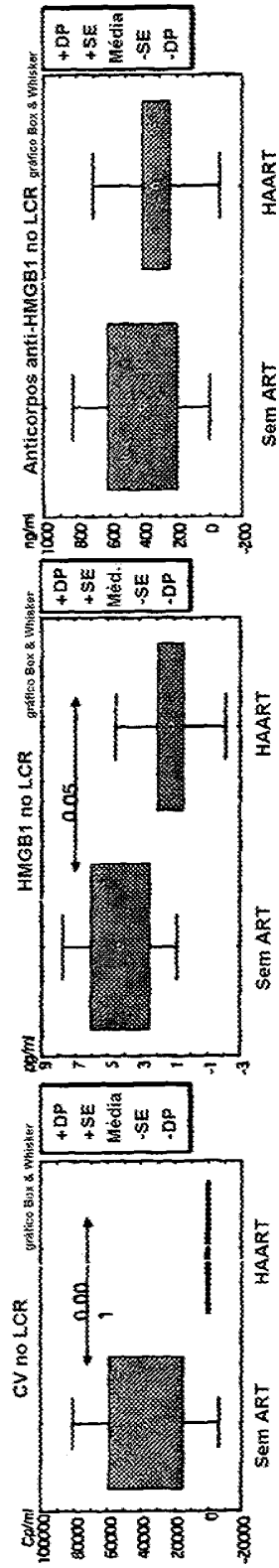


Fig. 9

A



B

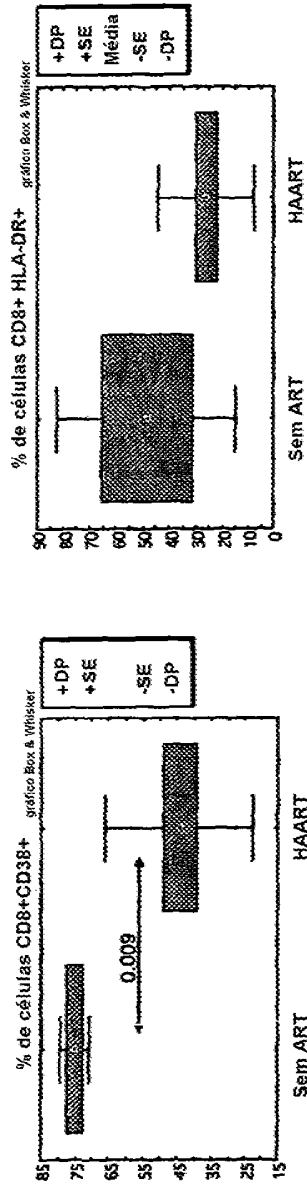
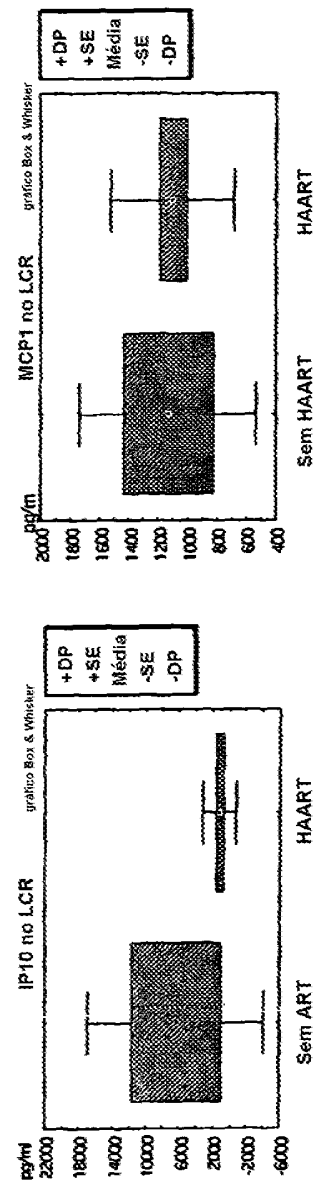


Fig. 10

C



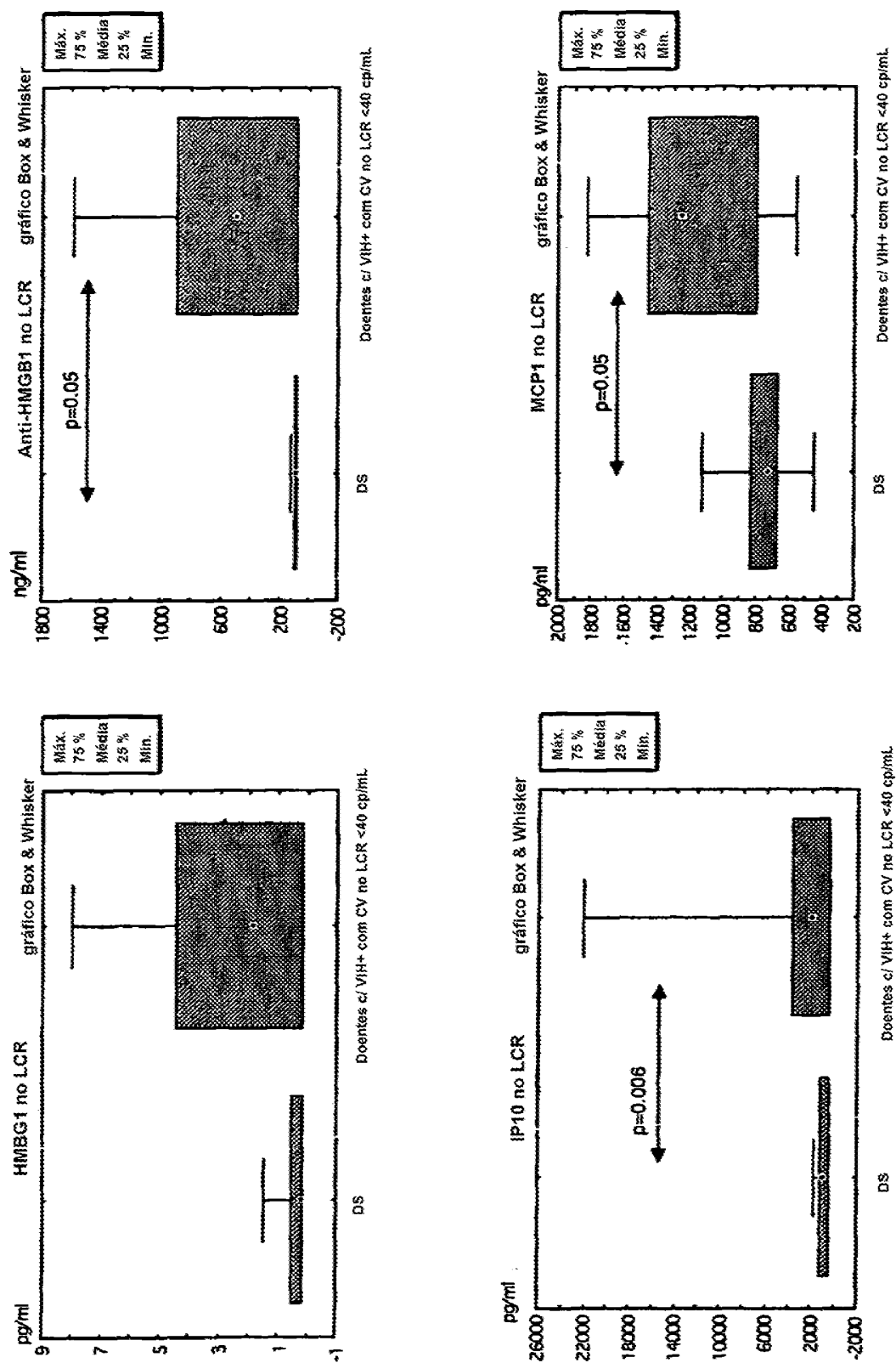


Fig. 11

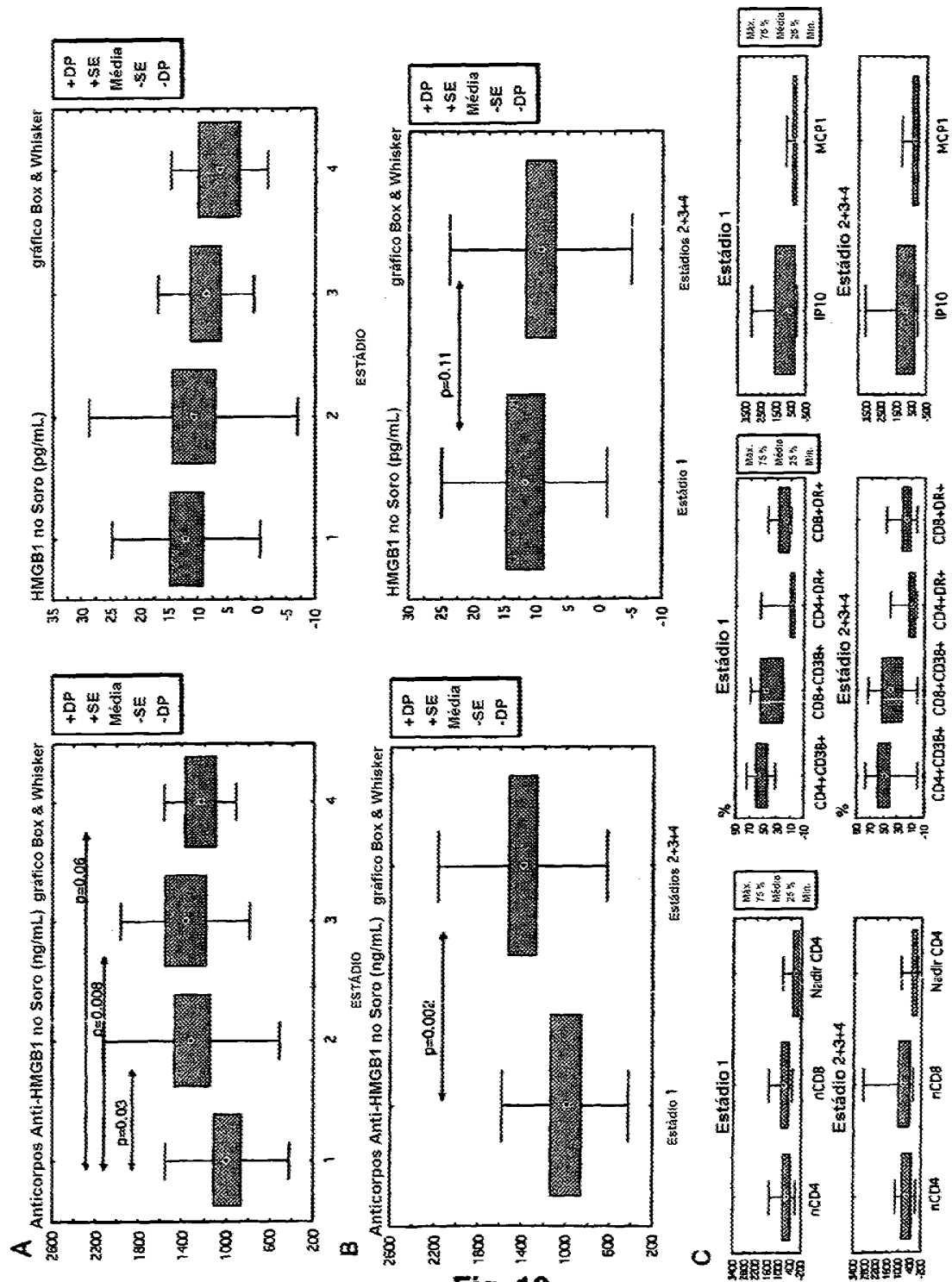


Fig. 12

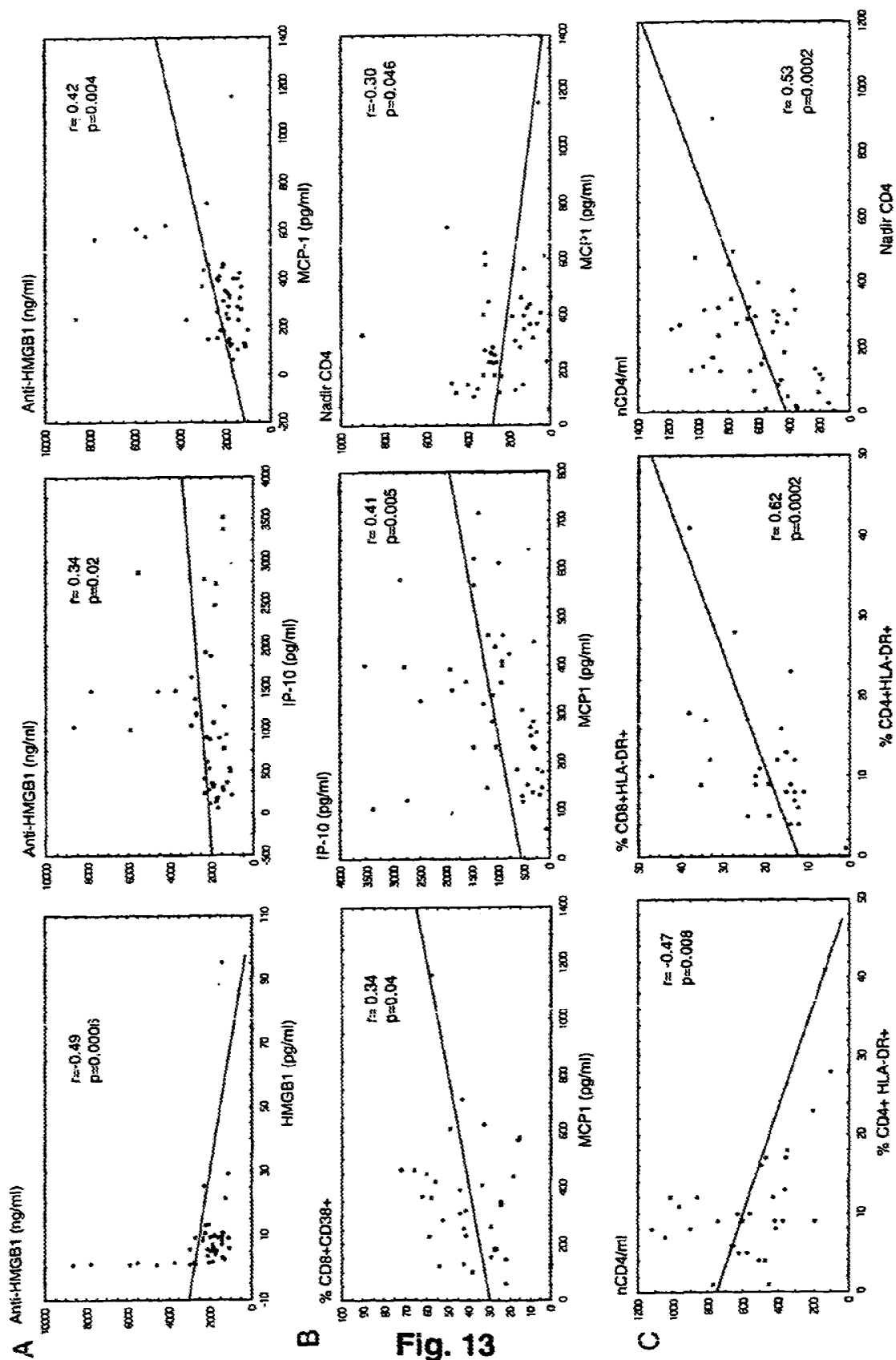


Fig. 13