

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 488**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G06F 19/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08160749 .1**
96 Fecha de presentación: **18.04.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **2011889**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **MÉTODOS PARA MEDIR LA RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS FRENTE A HCV.**

30 Prioridad:
18.04.2000 US 197606 P
22.06.2000 US 213219 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.02.2012

73 Titular/es:
VIRCO BVBA
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE

72 Inventor/es:
Larder, Brendan;
Bloor, Stuart;
Hertogs, Kurt;
Dehertogh, Pascale Alfons Rosa y
Mortier, Rudy Jean Marc

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 373 488 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

Métodos para medir la resistencia a los fármacos frente a HCV.

CAMPO DE INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a métodos y sistemas para predecir la resistencia de una enfermedad a un agente terapéutico. Más específicamente, la invención proporciona métodos para predecir la resistencia a los fármacos correlacionando la información genotípica con perfiles fenotípicos. La invención se refiere además a métodos y sistemas para diseñar, optimizar y evaluar la eficiencia de un régimen terapéutico basado en el genotipo de la enfermedad que afecta al paciente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Las técnicas para determinar la resistencia de un patógeno o célula cancerosa a un agente terapéutico están volviéndose cada vez más importantes. Por ejemplo, a pesar de las grandes ventajas de los tratamientos existentes contra infecciones virales tales como infección por VIH, cáncer e infecciones bacterianas, muchos pacientes experimentan el fracaso del tratamiento o una reducida eficacia en el tiempo. En muchos casos esto es debido al patógeno, célula cancerosa, bacteria, virus u otro estado de la enfermedad que muta y/o desarrolla una resistencia al tratamiento.

15 Por ejemplo, todos los fármacos en el campo de HIV fueron descubiertos y desarrollados en un período de 15 años, comenzando con AZT. A comienzos del año 2000, 15 agentes diferentes anti-HIV-1 habían sido aprobados por la FDA. Inicialmente, y debido a la falta de fármacos alternativos, estos agentes se administraron solos, como monoterapia. Aunque se observó un efecto antiviral temporal, todos los compuestos perdieron su efectividad en el tiempo. En 1989, Larder et al. publicaron un artículo en Science, 246, 1155-8, que identificó un número de mutaciones que causaron resistencia del HIV-1 a AZT. Desde entonces, la investigación ha demostrado que una de las razones principales detrás del fracaso del tratamiento para todos los fármacos antivirales es el desarrollo de resistencia del virus al fármaco.

20 La resistencia a los fármacos y mutaciones resistentes a los fármacos se desarrollan porque los retrovirus tales como HIV no tienen un mecanismo de reparación cuando sintetizan nuevas cadenas de ácidos nucleicos. Esto permite la generación continua de un número de variantes genéticas en una población viral que se replica. Más importante aún, los cambios genéticos pueden alterar la configuración de las moléculas de transcriptasa reversa (RT) y proteasa (PR), de tal manera que ya no son susceptibles a la inhibición por los compuestos desarrollados para esas dianas. Si la terapia antirretroviral es continuada y si la replicación viral no se suprime completamente, la selección de variantes genéticas es inevitable, y la población viral se vuelve resistente al fármaco.

25 Ante el fracaso de la monoterapia y motivada por un número de ensayos clínicos, en la primera mitad de la década de los 90 la estrategia de tratamiento cambió a terapia de combinación, es decir, administración de mezclas de fármacos antivirales. En ese momento todavía existía solamente una clase de fármacos disponibles - inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (NRTIs). Como resultado, el estándar de referencia se convirtió en dos nucleósidos, típicamente AZT+ddl, o AZT+ddC. La terapia de combinación dual proporcionó un mayor control de la replicación viral, hizo más difícil que los virus desarrollaran cepas o mutaciones resistentes, y, como resultado, proporcionó amplio beneficio clínico a los pacientes.

30 En 1995, se alcanzó otro hito con la aprobación del primero de los inhibidores de proteasa (PI). Estos inhibidores mostraron mayor potencia que los nucleósidos, pero de nuevo fueron propensos a resistencia cuando se usaron solos. Su combinación con dos análogos de nucleósidos, sin embargo, pareció proporcionar el control sobre el virus que todo el mundo había estado buscando. La terapia de combinación triple, que usa dos nucleósidos (más comúnmente AZT+3TC) más un inhibidor de proteasa (típicamente indinavir), aún continúa siendo el estándar más común de referencia en los países desarrollados.

35 Estas combinaciones altamente activas han tenido un enorme efecto en la calidad de vida y en la supervivencia de los pacientes. Esto ha dado como resultado menos hospitalizaciones y la reincorporación de los pacientes a la sociedad. En un número considerable de pacientes, la carga viral se ha reducido por debajo del límite de detección durante períodos prolongados.

40 En años recientes, sin embargo, se ha hecho claro que aún pacientes que son tratados con la terapia triple, que incluye un inhibidor de proteasa, a menudo eventualmente el tratamiento de experiencia fracasa. Los datos sugieren que hasta la mitad de los pacientes con terapia de combinación no logran o no mantienen la supresión de la replicación del virus. En algunos casos, puede ser que incluso la terapia triple del estado de la técnica sea insuficiente para detener la replicación viral. Como resultado, se desarrollan cepas de los virus resistentes a los fármacos.

Otro factor que contribuye a la dificultad para mantener la supresión de la replicación del virus ha sido la absoluta

carga de tomar hasta 20 píldoras cada día, en momentos fijos, con o sin alimentos, día tras día. Es simplemente poco realista esperar que las personas se adhieran a tales regímenes exigentes y demandantes indefinidamente. Pero si los pacientes no se adhieren, el precio puede ser alto. Una caída en los niveles sanguíneos de cualquiera de las medicaciones da al virus una oportunidad para replicarse y desarrollar cepas resistentes a los fármacos. Como tal, durante el transcurso de la infección, pueden surgir muy rápidamente cepas virales resistentes a los fármacos, particularmente para las infecciones retrovirales tales como HIV-1. Además, no todas las infecciones por HIV-1 se originan con una cepa de tipo salvaje, sensible al fármaco, de la que surgirá la resistencia al fármaco. Con el incremento en la prevalencia de cepas resistentes a los fármacos viene el incremento en infecciones que realmente comienzan con cepas resistentes a los fármacos. Las infecciones con resistencia a los fármacos pre-existentes reducen inmediatamente las opciones de fármacos para el tratamiento con fármacos, y enfatizan la importancia de la información de la resistencia a los fármacos para optimizar la terapia inicial para estos pacientes.

Además, a medida que ha aumentado el número de agentes antirretrovirales disponibles, así también lo ha hecho el número de posibles combinaciones de fármacos y terapias de combinación. Sin embargo, no es fácil para los médicos establecer la combinación óptima para un individuo. Previamente, las únicas pautas de tratamiento que han estado en amplio uso se han basado en la carga viral y, allí donde estuviese disponible, en la historia de tratamiento del paciente. El objetivo de los médicos es mantener la carga viral tan baja como sea posible. Un incremento en la carga viral es una alerta de que el control de la replicación viral se está perdiendo, y de que se necesita un cambio en la terapia. La carga viral, sin embargo, no proporciona información o guía con relación a cuales fármacos deben usarse.

El conocimiento de los patrones de resistencia de los diferentes inhibidores y la historia de tratamiento de los pacientes pueden ayudar. La emergencia de la resistencia es altamente predictiva del fracaso del tratamiento. De hecho, aunque existe una variedad de factores que pueden contribuir al fracaso de la terapia farmacéutica, casi siempre está involucrada la resistencia al fármaco del HIV-1. Sin embargo, las interacciones entre las diferentes mutaciones virales relacionadas con diferentes inhibidores es tan compleja que la selección de la combinación de tratamiento óptima con solamente una historia de tratamiento para proceder está lejos del ideal. Los fármacos pueden ser descartados innecesariamente, y se pueden introducir fármacos inefectivos. Incluso si el virus es resistente a solo uno de los tres fármacos en un régimen de tratamiento, este puede permitir que tenga lugar un nivel bajo de replicación viral y se desarrollen cepas virales resistentes a los otros dos fármacos.

Está claro que aunque existen muchos fármacos disponibles para uso en terapia de combinación, las selecciones se pueden agotar rápidamente, y el paciente puede experimentar rápidamente progresión clínica o deterioro si se toman decisiones erróneas de tratamiento. La clave para la terapia individualizada, hecha a medida, se basa en el establecimiento efectivo de los perfiles de las poblaciones de virus de pacientes individuales en términos de sensibilidad o resistencia a los fármacos disponibles. Esto significará el advenimiento de una terapia verdaderamente individualizada.

El objetivo de la monitorización de la resistencia es proporcionar la información necesaria para posibilitar a los médicos prescribir la combinación de fármacos más óptima para el paciente individual. En la actualidad, existen dos enfoques diferentes para medir la resistencia:

El primer enfoque implica el fenotipado, que mide directamente la sensibilidad real de un patógeno o célula cancerosa del paciente a agentes terapéuticos particulares. Por ejemplo, el ensayo del fenotipo del HIV-1 mide directamente la resistencia al fármaco del HIV-1, detectada como la habilidad del HIV-1, tomado de un paciente, para crecer en el laboratorio en presencia de un fármaco. El fenotipo se mide, por ejemplo, expresado como IC₅₀ o como el número de veces de resistencia para una fármaco particular, que se define como la concentración de fármaco requerida para exterminar la mitad de los viriones en una muestra. Esta se compara con la IC₅₀ para el fármaco usando virus de tipo salvaje. El fenotipo se describe habitualmente o se puede expresar en términos del número de veces de incremento en IC₅₀ para cada uno de los fármacos.

Existen tres tipos principales de metodologías para el fenotipado. Uno de esos tipos es el ensayo de reducción de placas. Un inconveniente de este método es que este no detecta las cepas de NSI. Otro método de fenotipado incluye ensayos de inhibición del crecimiento de p24 en PBMC (Japour, A.J., Mayers, T.L., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Beckett, L.A., Arduino, J.M., Lane, J., Black, R.J., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Crumpacker, C.S., The RV-43 Study Group & The ACTG Virology Committee Resistance Working Group. 1993. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1095-1101). Un problema con esta técnica es que el cultivo del virus a partir de las PBMCs es muy lento y laborioso. Además, pierde la precisión de otras técnicas y, debido a que se basa en células humanas primarias para el crecimiento de los virus, la automatización del ensayo y la producción elevada es virtualmente imposible. Aun otro método es el ensayo de virus recombinante (Kellam, P. y Larder, B.A. 1994. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 23-30). El método recombinante tiene ventajas sobre los ensayos previamente mencionados, por cuanto reduce la cantidad de selección que tiene lugar durante el crecimiento del virus en el laboratorio, es más rápido, más reproducible, susceptible a la automatización y a la producción elevada, y todos los fármacos disponibles pueden ser probados en un ensayo.

El segundo enfoque para medir la resistencia implica ensayos de genotipado que detectan cambios genéticos específicos (mutaciones) en el genoma viral, que conducen a cambios de aminoácidos en al menos una de las proteínas virales, conocidas o sospechosas de estar asociadas con la resistencia.

5 Existen un número de técnicas para llevar a cabo el genotipado, tales como los ensayos de mutación de punto basados en la hibridización, y secuenciación de ADN. Los ensayos de mutación de punto habituales incluyen PCR específica de cebadores (Larder BA, Kellam P y Kemp, SD 1991. AIDS 5: 137-144), hibridización diferencial (Eastman, P.S., Urdea, M., Besemer, D., Stempien, M y Kolberg, J. 1995. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Human Retrovirol. 9, 264-273), Ensayo de Sonda en Línea (*LIPATTM*, *Innogenetics*) (Stuyver, L., Wyseur, A., Rombout, A., Louwagie, J., Scarcez, T., Verhofstede, C., Rimland, D., Schinazi, R. F. y Rossau, R. 1997. Antimicrob. Agents Chemotherap. 41, 284-291), y secuenciación de chips de genes (*Affymetrix*) (D'Aquila, R.T. 1995. Clin. Diagnost. Virol. 3, 299-316). Los ensayos de mutaciones de punto pueden proporcionar solamente una pequeña parte selecta de la imagen de resistencia. La secuenciación de ADN, sin embargo, proporciona información sobre los nucleótidos en la región del genoma secuenciado. Esto significa que se pueden detectar cambios en el genoma. Sin embargo, en la actualidad sigue siendo difícil interpretar los resultados de una prueba genotípica para proporcionar conclusiones significativas acerca de la resistencia al agente terapéutico. La ventaja del fenotipado sobre el genotipado es que el fenotipado es una medida directa de cualquier sensibilidad que resulta de todas las mutaciones que han ocurrido, y cualesquiera interacciones entre ellas. Como tal, esto es el patrón de oro de la prueba de resistencia. Las desventajas del fenotipado son que es compleja, larga de ejecutar (habitualmente 4 semanas) y, por lo tanto, más cara que el genotipado. De este modo, el fenotipado no es una manera práctica de diseñar la terapia del paciente.

En el documento WO 99/67427 se describe una lista de mutaciones que se sabe que influyen sobre la sensibilidad del HIV a la terapia con fármacos. El método usa la amplificación del ácido nucleico y estableció (usando un ensayo de susceptibilidad fenotípica) que las mutaciones en varios codones están correlacionadas con una disminución en la susceptibilidad al fármaco específico.

25 En AIDS, vol 12, suppl 4, Nov 1998, página S11 se describe un estudio general de aislados de HIV de perfiles de resistencia fenotípicos y genotípicos a inhibidores de proteasas utilizando una prueba para la susceptibilidad fenotípica a fármacos antirretrovirales, el llamado método Antivirogram® basado en virus recombinante derivado de ARN plasmático.

30 En Nucleic Acids Research, p. 271-274, 1998, JP Cecile et al. describieron un análisis de correlación de genotipo-fenotipo relacionado con cáncer usando una base de datos computarizada de mutaciones de línea germinal (70 entradas) y somáticas (28 entradas) del gene WT1 dado a conocer en la bibliografía.

En Vizmanos et al (1998), J of Vir. Hepatitis, p 227-240, se describe la variabilidad de varios fragmentos subgenómicos del HCV procedentes de la región sin traducir de 5' (5'-UTR) y las regiones E1, E2/NS1 y NS5, comparando, para cada posición, todas las secuencias publicadas en GenBank.

35 En Maggi et al (1999), J. of Med. Virology (57) p.57-63, se describe que el crecimiento de HCV en cultivos de PBMC de donantes sanos estimulados apoya el concepto de que la divergencia genética puede provenir, al menos en parte, de la adaptación del virus al crecimiento en diferentes tipos celulares.

40 La importancia de la velocidad por la cual un médico puede ser informado del perfil de resistencia del paciente puede ser demostrada por el siguiente ejemplo hipotético pero realista, el cual resalta la necesidad de reducir la complejidad y mejorar el tiempo de ejecución de la evaluación de la resistencia. Supóngase que la terapia de combinación triple de primera-línea reduce la carga viral a límites indetectables durante un periodo de tiempo. La carga viral comienza entonces a incrementarse como resultado del desarrollo de la resistencia. Sin información de la resistencia, el médico puede hacer un juicio basado en la historia de tratamiento del paciente, y cambiar uno o más de los fármacos. Como resultado, la carga viral se reduce de nuevo, pero el nuevo régimen de tratamiento es sub-óptimo, de manera que la replicación viral continúa bajo la presión de selección de fármacos, y la resistencia se desarrolla rápidamente una vez más. Consecuentemente, se pierde el control de la replicación viral y varios de los 45 15 fármacos disponibles se han "gastado".

50 Aunque los ensayos de genotipado pueden ser llevados a cabo más rápidamente, un problema con el genotipado es que existen ahora alrededor de 100 mutaciones individuales con signos de un efecto sobre la susceptibilidad a los fármacos anti-HIV-1, y se están descubriendo constantemente otras nuevas, en paralelo con el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias de tratamiento. La relación entre estas mutaciones de punto, supresiones e inserciones y la susceptibilidad real del virus a la terapia con fármacos es extremadamente compleja e interactiva. Un ejemplo de esta complejidad es la mutación M184V que confiere resistencia a 3TC pero invierte la resistencia a AZT. La mutación 333D/E, sin embargo, invierte este efecto y puede conducir a una resistencia dual a AZT/3TC.

55 Consecuentemente, la interpretación de los datos genotípicos es tanto altamente compleja como críticamente importante. Ha habido un número de diferentes enfoques a este reto de interpretación. Por ejemplo, armado con el conocimiento de las principales mutaciones de la resistencia asociadas con cada fármaco y la historia de tratamiento

reciente del paciente, un médico toma una decisión como el tratamiento óptimo. Para ayudar al médico a hacer esos juicios, se han convocado a diversos paneles de opinión de expertos, y han publicado guías, por ejemplo el Resistance Collaborative Group. Además, los algoritmos basados en reglas constituyen otro enfoque. Es esencialmente una versión formalizada de lo anterior con tablas que dan las mutaciones que están asociadas con la resistencia a cada uno de los fármacos. Estas pueden ser simples tablas impresas, o la información puede ser usada para desarrollar un algoritmo de ordenador basado en reglas. Sin embargo, dado el gran número de mutaciones que están implicadas en la resistencia a los fármacos antirretrovirales, y dadas las interacciones complejas entre las mutaciones, la falta del genotipado es la interpretación fiable y la aplicación clínica de los resultados. A medida que existen más fármacos y a medida que están involucradas más mutaciones en el desarrollo de la resistencia, el “manual” o interpretación basada en reglas de datos brutos del genotipo se hace rápidamente imposible debido a un incremento en la complejidad.

Por lo tanto, el reto principal implicado en la genotipado es mejorar la interpretación de los resultados. La tecnología identificará algunas (es decir, ensayos de mutación de punto) o todas las mutaciones (es decir, secuenciación de ADN) que se han producido, pero entonces requiere una interpretación sofisticada para predecir qué efecto neto de estas mutaciones podría haber sobre la susceptibilidad de la población de virus a los diversos agentes terapéuticos. Un médico podría entonces tener que combinar esta información con toda la otra información relacionada con el paciente, y decidir qué significa todo esto en términos de selección de fármacos para el tratamiento de su paciente individual.

Es por lo tanto un objetivo de la presente invención proporcionar métodos para mejorar la interpretación de los resultados genotípicos.

Es un objetivo adicional de la invención proporcionar métodos para determinar (o predecir) un fenotipo basado en un genotipo.

Es también un objetivo adicional de la invención proporcionar métodos para predecir la resistencia de un patógeno o una célula cancerosa a una terapia o agente terapéutico.

Es también un objetivo adicional de la invención predecir la resistencia de un paciente a la terapia.

Es también un objetivo de la invención proporcionar métodos para evaluar la efectividad o la eficiencia de una terapia, o para optimizar una terapia al paciente.

Resumen de la invención

Una solución a los problemas expuestos anteriormente implica nuevos métodos para medir la resistencia a los fármacos correlacionando la información genotípica con los perfiles fenotípicos.

En la presente invención, los métodos ponen juntos el conocimiento de una base de datos tanto genotípica como fenotípica, y determina un valor del número de veces de la resistencia fenotípica (virtual) sin tener realmente que hacer el ensayo fenotípico. La base de datos genotípica contiene las mutaciones en los virus de HIV evaluados, comparados con el virus de HIV de referencia (tipo salvaje). La base de datos fenotípica contiene valores de resistencia fenotípica para los virus de HIV evaluados, con una determinación del número de veces de la resistencia comparada con el virus de HIV de referencia (tipo salvaje). Como se describe debajo, este análisis puede ser hecho comparando la secuencia del virus de HIV bajo ensayo, por ejemplo a partir de una muestra de paciente, frente a las secuencias almacenadas, y seleccionando “secuencias similares”. La información fenotípica se reúne entonces para aquellas “secuencias similares”, y la resistencia en número de veces media o mediana puede ser calculada a partir de los valores fenotípicos seleccionados. Este valor se denomina “Número de veces de la Resistencia Virtual”, la cual conduce al “Fenotipo Virtual”.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con una primera realización, la presente invención se refiere a un método para determinar o predecir un fenotipo virtual de un virus de hepatitis C (HCV), por ejemplo en una muestra biológica, que comprende:

- a) obtener una secuencia genética a partir de dicho HCV,
- b) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, y en el que dicha al menos una mutación o patrón de mutación se va a asociar con la resistencia a al menos una terapia o agente terapéutico,
- c) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipos con un patrón de mutación similar a al menos uno de los patrones de mutación identificados en la secuencia genética en b),
- d) correlacionar cada entrada de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de

datos de fenotipos, y

- e) calcular el número de veces de la resistencia virtual de dicho virus a partir de todos los fenotipos de la base de datos identificados.

5 La misma metodología del método descrito anteriormente puede ser usada por ejemplo para evaluar las terapias aplicadas actualmente, o para predecir resistencia de un paciente a una terapia.

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a un método para evaluar la efectividad de una terapia de un paciente o para monitorizar una terapia de un paciente, que comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica procedente de un paciente,
- b) obtener una secuencia genética del HCV en dicha muestra biológica,
- 10 c) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, en el que dicha al menos una mutación está asociada con resistencia a al menos una terapia que está actualmente siendo administrada al paciente,
- d) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipo con un patrón de mutación similar a al menos uno de los patrones de mutación identificados en la secuencia genética en c),
- 15 e) correlacionar dicha entrada de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de datos de fenotipos,
- f) calcular el número de veces de la resistencia virtual de dicho virus a partir de todos los fenotipos de la base de datos identificados,
- g) obtener una serie de fenotipos repitiendo las etapas b) a e) para cada terapia que está siendo
- 20 actualmente administrada al paciente, y,
- h) evaluar la efectividad de la terapia del paciente a partir de series de fenotipos.

También, la invención se refiere a un método para optimizar la terapia para un paciente, que comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica de un paciente
- b) obtener una secuencia genética a partir de HCV en dicha muestra biológica,
- 25 c) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, y en el que dicha al menos una mutación está asociada con la resistencia a al menos una terapia,
- d) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipos con un patrón de mutación similar a al menos uno de los patrones de mutación identificados en la secuencia genética en c),
- 30 e) correlacionar dichas entradas de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de datos de fenotipos,
- f) calcular el número de veces de la resistencia virtual de dicho virus a partir de todos los fenotipos de la base de datos identificados.
- g) obtener una serie de fenotipos repitiendo las etapas b) a e) para un grupo de terapias, y,
- 35 h) optimizar la terapia para el paciente a partir de las series de fenotipos.

Aunque descrita en los ejemplos con respecto a los virus, particularmente HIV, la presente invención tiene una amplia aplicabilidad para cualquier estado de enfermedad en el que se desee correlacionar información genotípica con los perfiles fenotípicos. Un experto en la técnica podría fácilmente tomar la siguiente discusión de la invención con el virus HIV y, a través del ejercicio de pericia normal, aplicar esta invención a otras enfermedades (tales como

40 otras infecciones virales, células cancerosas, cáncer, infecciones bacterianas, otros patógenos, y similares) para correlacionar la información genotípica para predecir la respuesta fenotípica, evaluar la resistencia a fármacos, y eventualmente desarrollar un régimen de tratamiento de fármacos para un paciente particular. Un experto en la técnica sabrá también que muchas especies de virus comprenden muchas cepas, por ejemplo el HIV comprende,

45 además de HIV-1, también HIV-2, y ambos grupos se dividen además en grupos, por ejemplo, pero sin limitarse a, grupos O ó M para HIV-1.

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a un método para predecir la

resistencia de HCV a la terapia, que comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica de un paciente que contiene HCV,
- b) obtener una secuencia genética a partir de dicho HCV,
- 5 c) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, y en el que dicha al menos una mutación está asociada con resistencia a al menos una terapia,
- d) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipos con un patrón de mutación similar al patrón de mutación identificado en la secuencia genética en c),
- 10 e) correlacionar dicha entrada de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de datos de fenotipos,
- f) obtener una serie de fenotipos repitiendo las etapas b) a e) para un grupo de terapia, y,
- g) predecir la resistencia del paciente a la terapia a partir de la serie de fenotipos.

15 Se entenderá que los principios y métodos proporcionados por esta solicitud están destinados a proporcionar al médico que impone el tratamiento un medio para optimizar o seleccionar la terapia que será más exitosa. El principio es de particular relevancia para el tratamiento(o monitorización de la terapia) de infecciones virales. Estos estados de enfermedades están sujetos a regímenes de terapia complejos y que varían continuamente, y por lo tanto el paciente bajo tratamiento necesita experimentar una monitorización frecuente de la terapia a fin de seguir el efecto del fármaco o para optimizar o seleccionar el manejo óptimo del paciente.

20 Los métodos de la presente invención determinan un fenotipo sin tener realmente que hacer la prueba fenotípica. Dentro de este significado, el término “determinar” es intercambiable con “predecir” o “diagnosticar”.

Un “paciente” puede ser cualquier organismo, particularmente un ser humano u otro mamífero, que sufre una enfermedad o que necesita o desea un tratamiento para una enfermedad. Un paciente incluye cualquier mamífero, incluyendo animales de granja o animales domésticos, e incluye seres humanos de cualquier edad o estado de desarrollo.

25 Una “muestra biológica” puede ser cualquier material obtenido de una manera directa o indirecta de un paciente que comprende un agente que produce una enfermedad o que causa una enfermedad. Dicho agente que produce una enfermedad es capaz de ser secuenciado. A este respecto, las expresiones muestra biológica y agentes que producen una enfermedad y agentes que causan una enfermedad son intercambiables en la invención. Una muestra biológica se puede obtener de, por ejemplo, saliva, semen, leche materna, sangre, plasma, heces, orina, muestras de tejidos, muestras de mucosas, células en cultivo de células, células que pueden ser además cultivadas, etc. Las muestras biológicas también incluyen muestras de biopsias. En una realización, para un paciente infectado con HIV, se puede usar cualquier muestra biológica que contenga el virus. En una realización, para un paciente infectado con un virus, cualquier muestra biológica que contenga el virus se puede usar en cualquiera de los métodos de la invención. Preferiblemente, dicho virus es un retrovirus. Preferiblemente, la muestra biológica contiene un virus seleccionado de HIV, HCV (Virus de la hepatitis C) y HBV (virus de la hepatitis B).

40 “HIV” es el virus de la inmunodeficiencia humana, el cual es un retrovirus. “Retrovirus” es cualquier virus de ARN que utiliza la transcriptasa reversa durante su ciclo de vida. “HCV” es el virus de la hepatitis humana, el cual es un virus de ARN. “HBV” es el virus de la hepatitis B humana, el cual es un virus de ADN, pero que comparte algunas características de los retrovirus, por cuanto también exhibe una actividad de transcriptasa reversa por la cual el ARN genómico es traducido a ADN en el virus.

De acuerdo con todavía otra realización preferida, la muestra biológica en cualquiera de los métodos puede contener células, células de tejidos.

En una realización, en la muestra biológica está presente un ácido nucleico o proteína diana a partir de la cual se puede derivar una secuencia genética o secuencia proteica.

45 Una “secuencia genética” es cualquier secuencia que contiene al menos un nucleótido. Un nucleótido, por ejemplo, puede ser representado por las letras A, C, T o G. Una combinación de nucleótidos puede ser representada, por ejemplo, por otras letras, tales como R, Y, M etc. Los aminoácidos son representados por su propio código. Una perspectiva general de las abreviaturas usadas para los ácidos nucleicos y aminoácidos puede ser encontrada en Alberts, B., Bay, D. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. The Molecular Biology of the Cell, Garland publishing, Nueva York, 1994.

50 Las secuencias genéticas como se usan aquí se pueden referir a la secuencia completa de un agente que produce

una enfermedad, o al menos un segmento de la secuencia de un agente que produce una enfermedad. La secuencia de una proteína diana particular se puede obtener secuenciando el ácido nucleico que codifica la proteína diana, o secuenciando la propia proteína. La secuenciación de la proteína se puede obtener, por ejemplo, pero sin limitarse a, la degradación química de Edman clásica ("Sequence determination" Edman P. Mol. Biol. Biochem. Biophys. 1970, 8, 211-255). Esta química también se puede automatizar completamente. Técnicas nuevas, que incluyen la espectroscopía de masas, también permiten el análisis de la secuencia de una proteína bajo investigación ("Mass spectroscopy from genomes to proteomics" Yates J. Trends in genetics 2000, 16, 5-8) Alternativamente, la secuencia de una proteína diana se puede obtener usando protocolos de secuenciación clásicos, por ejemplo protocolos de terminación de la cadena de extensión (técnica de Sanger) ("DNA sequencing with chain terminating inhibitors" Sanger F., Nichler., Coulson A. Proc. Nat. Acad. Sci. 1977,74, 5463-5467) o protocolos de corte de cadena. Las metodologías particulares de secuenciación fueron desarrolladas, por ejemplo, por Visible Genetics. Se entenderá que se han desarrollado nuevos enfoques para descifrar la secuencia de un ácido nucleico diana, incluyendo, pero sin limitarse a, la espectrometría de masas, MALDI-TOF (espectroscopía de tiempo de vuelo e ionización/desorción mediante láser asistida por una matriz) ("Differential sequencing with mass spectroscopy" Graber J, Smith C., Cantor C., Genet. Anal. 1999,14, 215-219.) análisis de chips (técnicas basadas en hibridación) (Multiplexed biochemical assays with biological chips. Fodor S P; Rava R P; Huang X C; Pease A C; Holmes C P; Adams C L Nature 1993, 364, 555-6). Se debería apreciar que la secuenciación del ácido nucleico cubre la secuenciación de tanto el ADN como el ARN.

El término "codón", donde quiera que se use en la presente invención, se refiere a la posición del aminoácido presente en esa localización específica del gen investigado. Por ejemplo, una mutación en el codón 90 del gen de la proteasa se refiere a un aminoácido alterado en la posición 90 en la cadena de proteína, comparado con el gen de tipo salvaje.

El ácido nucleico puede estar presente en la muestra biológica en forma libre y/o soluble, o puede estar encapsulado por proteínas, tales como en virus. En realizaciones preferidas de la invención, el ácido nucleico puede estar presente en una célula, tal como una célula de tejido.

El término "fenotipo" puede incluir cualquier propiedad observable de un organismo o agente que produce una enfermedad que es producido por el genotipo, conjuntamente con el medio ambiente. En una realización, el fenotipo se refiere a la resistencia de un agente que produce una enfermedad a al menos una terapia. Por lo tanto, los métodos de la invención determinan un fenotipo de un agente que produce una enfermedad frente a al menos una terapia o agente terapéutico.

La expresión "fenotipo virtual" se refiere a un fenotipo de una muestra que se obtiene a través de la determinación del genotipo de dicha muestra, dicho genotipo se usa para la correlación en una base de datos para buscar genotipos de emparejamiento para los cuales se conoce un fenotipo correspondiente. A partir de esta colección de fenotipos, se calcula el fenotipo de la muestra.

Los métodos de la invención se pueden repetir para cada posible terapia o agente terapéutico conocido o sospechoso de estar asociado con resistencia, o con respecto al cual se puede esperar que aparezca una resistencia. Como tal, según otra realización de la invención, el fenotipo de una muestra biológica puede presentarse como una lista de fenotipos contra o con respecto a terapias individuales o agentes terapéuticos individuales. Esto se ilustra además en la sección de ejemplos.

La expresión "resistencia fenotípica" comprende la resistencia de una célula, virus, o células infectadas viralmente a una terapia ensayada, agente terapéutico o fármaco.

El término "resistencia", como se usa aquí, pertenece a la capacidad de resistencia, sensibilidad, susceptibilidad, o efectividad de una terapia frente a una enfermedad.

El término "terapia" incluye pero no está limitado a un fármaco, composición farmacéutica, bactericida, fungicida, antibiótico, o compuesto o composición contra el cáncer, antiviral, antibacteriano antifúngico, antiparasitario o cualquier otro compuesto o composición que pueda ser usada en terapia o tratamiento terapéutico. La terapia también incluye tratamiento, tal como terapia génica o terapia de radiación, útil para el tratamiento o mejora de una enfermedad en un paciente. La terapia, como se usa aquí, también incluye las terapias de combinación.

La presente invención también se puede aplicar para determinar el fenotipo de células (tejidos) normales o células no malignas para investigar su comportamiento con respecto a una terapia particular o agente terapéutico.

El término "mutación", como se usa aquí, abarca tanto las mutaciones genéticas como epigenéticas de la secuencia genética del agente que causa la enfermedad. Un cambio genético incluye, pero no está limitado a, (i) sustituciones de bases: polimorfismos de un solo nucleótido, transiciones, transversiones, sustituciones y (ii) mutaciones de desplazamiento del marco: inserciones, repeticiones y supresiones. Los cambios epigenéticos incluyen, pero no están limitados a, alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo metilación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, (cambios en) la metilación de restos de citosina en toda o sólo una parte de la secuencia genética. En la presente

invención, las mutaciones también pueden ser consideradas a nivel de la secuencia de aminoácidos, y comprende, pero no están limitadas a, sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos.

La "secuencia de control" o "tipo salvaje" es la secuencia de referencia a partir de la cual se basa la existencia de las mutaciones. Por ejemplo, una secuencia de control para HIV es HXB2. Este genoma viral comprende 9718 pb, y tiene un número de acceso en el Genbank en NCBI M38432 o K03455 (número gi: 327742).

Las secuencias de referencia o tipo salvaje para uso en la invención en el campo de las enfermedades específicas, infecciones o enfermedades causadas por patógenos específicos pueden ser obtenidas fácilmente de las bases de datos disponibles públicamente. Por ejemplo, la influencia de las mutaciones en la etiología del cáncer puede ser ejemplificada por las mutaciones que influyen el efecto del gen supresor del tumor, tales como p53, TGF-beta, NF-1, WT-1 y Rb. También, mutaciones presentes en oncogenes tales como Ras, c-myc, c-raf, neu, e IL-2, y genes reparadores, por ejemplo, metilguanosisilo y metiltransferasa, pueden causar cambios en el fenotipo y/o efecto del fármaco.

En otra realización, una mutación que es una metilación de ácidos nucleicos puede ocurrir en la posición 5 de la citosina dentro del dinucleótido de CpG. En general, el dinucleótido de CpG está insuficientemente representado a través de todo el genoma del mamífero, pero se puede encontrar cerca de su frecuencia esperada en pequeñas áreas del genoma de alrededor de un kilobase, llamadas islas de CpG. Aunque las islas de CpG dan cuenta de solamente alrededor de 1% del genoma completo y 15% de los sitios de CpG genómicos totales, estas regiones contienen aproximadamente 50% de los dinucleótidos de CpG no metilados. La metilación, puede, por ejemplo, impactar estados de enfermedad, tales como síndrome del X frágil y de Rett, y también en el establecimiento del perfil de los fármacos. Véase, por ejemplo, Robertson et al., Nature Reviews, 2000 vol 1, p. 11-19, y Esteller M. et al., New England Journal of Medicine 2000, Vol 343:19, p.1350-1354.

La expresión "al menos una mutación que se correlaciona con resistencia a al menos una terapia" incluye, pero no está limitada a, mutaciones y combinación de mutaciones en una secuencia genética que influye en la sensibilidad de un agente que causa una enfermedad a una terapia. La al menos una mutación puede influir en la sensibilidad a una terapia específica, por ejemplo, un fármaco, o un grupo de terapias. La al menos una mutación puede, por ejemplo, incrementar y/o disminuir la resistencia de un agente que produce una enfermedad a una terapia. La al menos una mutación puede también, por ejemplo, incrementar y/o disminuir la influencia de otras mutaciones presentes en una secuencia genética que afectan a la sensibilidad de un agente que produce una enfermedad a una terapia.

En una realización, la al menos una mutación que se correlaciona con resistencia a al menos una terapia incluye mutaciones o combinaciones de mutaciones que son conocidas o sospechosas de influir en la sensibilidad a una terapia. Listas de mutaciones conocidas o sospechosas de influir en la sensibilidad de un agente que produce una enfermedad a una terapia se pueden encontrar, por ejemplo, en la bibliografía científica, patentes, y solicitudes de patentes, por ejemplo Schinazi, R.F., Larder, B.A. y Mellors, J.W. 1997. Int. Antiviral News. 5, 129-142 (1997); WO 00/78996; WO 99/67427; WO 99/61658; US 6.087.093; WO 00/73511; y Solicitud de Patente U.S. Serie nº 09/580/491, la Solicitud de Patente U.S. Serie nº 09/589,167 y "Método y sistema para predecir la resistencia al agente terapéutico y para definir las bases genéticas de la resistencia a los fármacos usando redes neurales".

Ejemplos de mutaciones conocidas o sospechosas de influir en la sensibilidad de un agente que produce una enfermedad a una terapia también se pueden encontrar en la Internet en <http://hiv-web.lanl.gov>; <http://hivdb.stanford.edu/hiv/>; o <http://www.viral-resistance.com>. Ejemplos adicionales de mutaciones presentes en el dominio RT de HIV que confieren resistencia a un inhibidor de transcriptasa reversa incluyen, pero no están limitados a, 69 C, 69 V, 69 T, 75A, 101I, 103T, 103N, 184T, 188H, 190E, 219N, 219Q, 221Y, 221I, y 233V. Ejemplos adicionales de mutaciones presentes en el dominio PR de HIV que confieren resistencia a un inhibidor de la transcriptasa reversa incluyen, pero no están limitados a, 24M, 48A, y 53L. Una mutación puede efectuar resistencia sola o en combinación con otras mutaciones. La terapia específica, por ejemplo un fármaco antirretroviral, para el cual una mutación puede efectuar resistencia se puede determinar por un experto en la técnica, por ejemplo usando el ensayo de monitorización de resistencia fenotípica, tal como, el ANTIVIROGRAM®.

Existen diferentes posibilidades para representar mutaciones en secuencias en la forma de patrones de mutación, algunas de los cuales son explicados con detalle en la sección de ejemplos. La expresión "identificar un patrón de mutación" en una secuencia genética se refiere a la identificación de mutaciones en una secuencia genética bajo ensayo comparada con una secuencia de tipo salvaje la cual conduce a un cambio en los ácidos nucleicos o aminoácidos, o conduce a la expresión alterada de la secuencia genética o la expresión alterada de la proteína codificada por la secuencia genética o la expresión alterada de la proteína bajo el control de dicha secuencia genética.

Un "patrón de mutación" comprende al menos una mutación que influye sobre la sensibilidad de al menos un agente que causa una enfermedad a al menos una terapia. Como tal, un patrón de mutación puede consistir solamente en una única mutación. Alternativamente, un patrón de mutación puede consistir en al menos dos, al menos tres, al

menos cuatro o al menos cinco mutaciones.

De acuerdo todavía con otra realización, un patrón de mutación es una lista o combinación de mutaciones o una lista de combinaciones de mutaciones que influyen en la sensibilidad de al menos un agente que causa una enfermedad a al menos una terapia. Un patrón de mutación puede ser construido, por ejemplo, buscando una secuencia genética para determinar la aparición de cada mutación de una serie de mutaciones. La existencia de una mutación o la existencia de una de un grupo de mutaciones puede entonces ser anotada. El patrón de mutación es construido, por ejemplo, una vez que una secuencia genética es buscada para determinar la aparición de cada mutación en las series. En una realización, un patrón de mutación es construido usando un grupo de mutaciones que se correlaciona con la resistencia a una terapia, construyendo de ese modo un patrón de mutación que es específico a una terapia. En una realización adicional, un patrón de mutación es construido buscando mutaciones en una secuencia genética en la que las mutaciones están enlazadas por al menos un operador lógico seleccionado de AND, OR, NOT, y NOR.

En una realización, la invención se refiere a cualquiera de los métodos descritos en la invención en el que el patrón de mutación comprende al menos dos mutaciones conocidas o sospechosas de estar asociadas con resistencia a al menos una terapia.

Además, la presente invención también se refiere a la identificación de "al menos un patrón de mutación" en una secuencia. Deberá estar claro a partir de lo siguiente que para cada muestra biológica (o para cada secuencia genética derivable de dicha muestra biológica), se pueden identificar varios (es decir, más de uno) patrones de mutación frente a una terapia única o un agente terapéutico único.

En una realización de la invención, la secuencia bajo ensayo es alineada con la secuencia de tipo salvaje, y el alineamiento o diferencias en el alineamiento son almacenados en un medio computarizado o una base de datos. Alternativamente, un patrón de mutación puede ser obtenido a partir de un alineamiento, representado por los aminoácidos mutados y sus posiciones en el(los) polipéptido(s). Deberá estar claro que la persona experta en la técnica conoce diferentes maneras de representar y/o manejar la información de alineamientos de secuencia, incluyendo el uso de algoritmos y programas de ordenador conocidos ("Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins" Eds. Baxenavis and Ouellete, 1998, John Wiley and Sons, Nueva York. Capítulo 7 "Sequence alignment and database searching" G. Shuler, Capítulo 8 Práctico "Aspect of multiple sequence alignment". A Baxenavis, y Capítulo 9 "Phylogenetic analysis" M. Hershkovitz y D. Leipe). Un ejemplo práctico de alineamientos de múltiples secuencias es la construcción de un árbol filogenético. Un árbol filogenético visualiza la relación entre diferentes secuencias, y puede usarse para predecir futuros sucesos, y retrospectivamente idear un origen común. Este tipo de análisis puede usarse para predecir una sensibilidad similar al fármaco para una muestra, pero también puede usarse para descifrar el origen de diferentes muestras de pacientes (es decir, el origen de la cepa viral).

De acuerdo con realizaciones preferidas de cualquiera de los métodos de la invención, el patrón de mutación similar es identificado alineando la secuencia genética de una célula o un patógeno en la muestra biológica con la secuencia genética de WT de dicha célula o patógeno.

De acuerdo con otra realización, "Agrupamiento Discreto" se usa para determinar cuándo las secuencias son "similares". "Similar" en este contexto no significa "exactamente" por igual, ya que ninguna secuencia individual concuerda con otra. Más bien, "similar", en este contexto, significa "que tiene mutaciones similares" o "que tiene mutaciones que tienen el mismo efecto frente a la resistencia contra fármacos inhibidores". Para ser capaces de definir los patrones de mutaciones que fueron considerados como "que tienen el mismo efecto", se puede construir una base de datos de patrones que está relacionada con el fármaco. Los patrones de mutación referidos aquí son llamados "puntos calientes". El término "punto caliente" se define aquí como una combinación de mutaciones que confiere resistencia a un fármaco definido.

Los puntos calientes describen mutaciones o agrupaciones de mutaciones (generalmente combinadas por operadores lógicos "OR" (|) o "AND" (&)) que están relacionadas con un cierto fármaco inhibidor. Una fármaco puede tener 1, 2, 3, 4 o más puntos calientes unidos a él. Otros operadores lógicos pueden ser "NOT", "NOR" etc., y la posibilidad de identificar INSERCIONES y SUPRESIONES en la secuencia de ADN.

Un ejemplo simplificado de, por ejemplo, una tabla de puntos calientes usada para evaluar la resistencia de secuencias de HIV frente a diferentes fármacos se puede representar como sigue:

Fármaco	#	Punto caliente
A	1	(mutaciónD mutaciónE) & (mutaciónF mutaciónG)
	2	mutaciónH mutaciónI
	3	mutaciónJ & mutaciónK

Fármaco	#	Punto caliente
B	4	mutaciónZ mutaciónX) & mutaciónV
	1	mutaciónL
	2	mutaciónM & mutaciónN
	3	mutaciónO & mutaciónP) mutaciónQ
C	1	mutaciónR
	2	mutaciónS mutaciónT

Posteriormente, a cada secuencia del virus de HIV que es ensayada se “realiza un perfil” ensayando la secuencia frente a todos los puntos calientes disponibles, para todos los fármacos inhibidores involucrados. Este análisis produce un perfil por fármaco para la secuencia de interés.

5 En una realización, para cada punto caliente emparejado, la secuencia recibe un “1”; para cada punto caliente no emparejado, consigue un “0”. Para una secuencia dada bajo ensayo, el resultado podría ser:

Fármaco	Perfil	
A	1010	se aplican los puntos calientes 1 y 3, los puntos calientes 2 y 4 no, para el fármaco A.
B	001	se aplica el punto caliente 3, los puntos calientes 1 y 2 no, para el fármaco B.
C	10	se aplica el punto caliente 1, el punto caliente 2 no, para el fármaco C.

10 Como tal, la expresión “perfil de terapia” o “perfil de fármaco” se refiere a la presentación de una secuencia genética como se explicó anteriormente. El término “perfil del fármaco o terapia” es la combinación de patrones de mutación correspondientes a la resistencia a un fármaco o terapia única.

15 En otras palabras, se puede dar un perfil de terapia para cada fármaco. En el ejemplo del fármaco A anterior, los puntos calientes 1 y 3 se refieren a la resistencia al fármaco A, y se les asigna un valor de 1. En contraste, los puntos calientes 2 y 4 no lo son, y se les asigna un valor de 0, de esta manera el perfil es “1010”. Este procedimiento puede verse como una forma de agrupamiento. Sin embargo, ya que los elementos del agrupamiento (0 y 1) están basados en los grupos predefinidos (puntos calientes), este método se denomina habitualmente como “agrupamiento discreto”.

20 La presente invención se refiere así a cualquiera de los métodos de la invención en los que el agrupamiento discreto es usado para identificar secuencias similares, o en los que la búsqueda de agrupamientos se usa para determinar patrones de mutación similares.

25 La invención se refiere además a los métodos descritos anteriormente en los que dichos patrones de mutación están enlazados con un operador lógico que define un perfil de terapia y en los que dicho perfil de terapia es representado por una secuencia, dicha secuencia es representada por una serie de 1 y/o 0, en la que 1 representa la presencia de un patrón de mutación en el perfil de terapia, y 0 la ausencia de un patrón de mutación en el perfil de terapia.

30 Debe ser entendido que los principios y métodos como se subrayó en la solicitud son muy dinámicos. Las bases de datos se actualizan frecuentemente para incorporar nuevas mutaciones, lo que mejora la exactitud de la determinación. El número y las combinaciones de mutaciones presentes en el sistema son actualizados regularmente (cada 3 a 4 meses). Esto es necesario para incorporar mutaciones o combinaciones identificadas recientemente que mejoran el comportamiento del sistema. Tomando menos mutaciones (o puntos calientes), una persona será capaz todavía de calcular el fenotipo; sin embargo, desde una perspectiva estadística, el comportamiento del sistema será menor. Además, esta actualización regular es requerida para anticipar el efecto de fármaco que son añadidos a la lista y que pueden tener su propia lista de mutaciones que causan resistencia a ese fármaco.

35 La persona versada en la técnica será consciente de aquellas mutaciones o combinaciones de mutaciones que influyen en la eficacia del fármaco. La información aquí puede ser encontrada en la Internet <http://hiv-web.lanl.gov>, <http://hivdb.stanford.edu/hiv/> o <http://www.viral-resistance.com>, o en los artículos, por ejemplo, Schinazi, R.F., Larder, B.A. y Mellors, J.W. 1997. Int. Antiviral News. 5, 129-142 (1997). Además, en algunas solicitudes de patentes se proporcionan listas de mutaciones. (Means and methods for monitoring protease inhibitor antiretroviral therapy and guiding therapeutic decisions in the treatment of HIV/AIDS (WO 00/78996), Means and methods for monitoring nucleoside reverse transcriptase inhibitor antiretroviral therapy guiding therapeutic decisions in the treatment of

HIV/AIDS (WO 99/67427), Means and methods for monitoring non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor antiretroviral therapy (WO 99/61658), Methods for detection of drug-induced mutations in the reverse transcriptase gene (US 6.087.093), New mutational profiles in HIV-1 reverse transcriptase correlated with phenotypic drug resistance (WO 00/73511), y New mutational profiles in HIV-1 reverse transcriptase correlated with phenotypic drug resistance (Pat. US Ser. nº 09/580/491).

En la presente invención, después de determinar los puntos calientes o la terapia para una secuencia bajo ensayo, puede ser necesaria una base de datos de genotipos en busca de secuencias similares a la secuencia bajo escrutinio. Esta consulta puede ser hecha usando búsquedas de agrupamientos.

La expresión "base de datos de genotipos" se refiere a los diversos tipos de bases de datos en las que es almacenada la información de secuencias. De acuerdo con una realización de la invención, la base de datos de genotipos almacena secuencias completas o parciales de nucleótidos. De acuerdo con otras realizaciones de la invención, la base de datos de genotipos almacena la secuencia de nucleótidos enlazadas a sus traducciones de aminoácidos, o almacena secuencias de nucleótidos enlazadas a al menos una lista de mutaciones particulares. Estas mutaciones son con respecto a una secuencia de referencia. También, estas mutaciones pueden ser a nivel de nucleótidos, o a nivel de los aminoácidos. Estas listas pueden incluir todas las mutaciones con respecto a una secuencia de referencia, o puede contener una selección de mutaciones.

La información proporcionada a la base de datos de genotipos, por lo tanto, también puede estar en forma de una secuencia completa o parcial de ácidos nucleicos relacionada con una muestra biológica, o puede estar en forma de una lista de mutaciones particulares que representan una secuencia particular de ácidos nucleicos relacionada con una muestra biológica. Por lo tanto, el término "entrada de genotipos" se refiere a cualquier forma en la cual la información es proporcionada a la base de datos de genotipos.

Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, una manera preferida de listar mutaciones en una base de datos de genotipos es listar mutaciones las cuales se sabe o se sospecha que están asociadas con resistencia a una terapia particular o agente terapéutico. Como tal, cada entrada de genotipos en la base de datos de genotipos puede estar enlazada a varias listas de mutaciones que ocurren en la secuencia genética relacionada con una muestra biológica, cada una de esas listas representativa para las mutaciones que se sabe o se sospecha que están asociadas con resistencia a una terapia particular o agente terapéutico frente al cual se sabe o se puede sospechar que aparezca una resistencia.

Con indiferencia del método usado para seleccionar "secuencias similares", una vez que se encuentra una selección de "secuencias similares", la aplicación consulta la base de datos de genotipos en busca de datos genotípicos pertenecientes a esas secuencias. La base de datos de genotipos puede ser construida de tal manera que, en una entrada de una base de datos, una secuencia genética (relacionada con una muestra biológica) está enlazada a un fenotipo. Alternativamente, los fenotipos en una base de datos de datos de genotipos pueden estar enlazados a otros medios de presentación de la información de secuencias de nucleótidos, por ejemplo un patrón de mutación o un perfil de mutación para una terapia, agente terapéutico o fármaco. Alternativamente, las bases de datos de relación de genotipos/fenotipos pueden ser usadas en cualquiera de los métodos de la invención para correlacionar la información genotípica con la fenotípica. En una realización, este proceso se realiza para cada terapia, agente terapéutico o fármaco, usando de nuevo la búsqueda de agrupamientos. La consulta devuelve una selección de resultados fenotípicos para cada terapia, agente terapéutico o fármaco listado. Se puede llevar a cabo un análisis estadístico en los datos para eliminar valores atípicos, y el número de veces de resistencia virtual puede ser calculado. Por ejemplo, por fármaco, la media del log (valores del número de veces de la resistencia) se puede usar para calcular el número de veces de la resistencia virtual, y la interpretación de estos números generará un Fenotipo Virtual. El fenotipo virtual (valor del número de veces de la resistencia) puede entonces además ser usado para clasificar el virus como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R).

La "resistencia" se determina usando los protocolos descritos en el ensayo Antivirogram® (documento WO 97/27480). La resistencia se determina con respecto a una cepa HIV LAI/IIIB de referencia de laboratorio. La diferencia en las IC_{50} entre la muestra del paciente y la cepa viral de referencia se determina como un cociente. Este cambio del número de veces en IC_{50} se da y es indicativo del perfil de resistencia de un cierto fármaco. Basado en los cambios de IC_{50} , se han establecido valores de corte para distinguir si una muestra es sensible o resistente a un cierto fármaco.

La expresión "base de datos de relación de genotipos/fenotipos" se refiere a una base de datos que pone juntos el conocimiento de la base de datos tanto genotípica como fenotípica. La base de datos genotípica, por ejemplo, contiene información de secuencias genéticas con respecto a al menos un agente que produce una enfermedad ensayado. La información de secuencia genética puede variar desde la secuencia completa de un agente que produce una enfermedad a un segmento de la secuencia de un agente que produce una enfermedad, a un patrón de mutación. Por ejemplo, la secuencia genética de los virus de HIV ensayados o el patrón de mutación de los virus de HIV ensayados. La base de datos fenotípica contiene valores de resistencia fenotípica para el al menos un agente que produce una enfermedad ensayado frente a al menos una terapia. Por ejemplo, los valores de resistencia

fenotípica de los virus de HIV ensayados, con una determinación del número de veces de la resistencia comparada con el virus de HIV de referencia (tipo salvaje).

5 En una realización, por ejemplo, los métodos pueden usar diferentes bases de datos de genotipos y fenotipos. A medida que una muestra se evalúa durante el análisis, las entradas de las secuencias identificadas y sus fenotipos correspondientes son encontrados y “transferidos” a una “Base de datos Central de Llamadas”. Este centro de llamadas es una tercera base de datos, en la que los resultados de fenotipos se combinan y se usan para el cálculo del número de veces de la resistencia virtual y la generación del informe. Esta base de datos es una base de datos de relación.

10 En una realización, en una base de datos de relación de genotipos/fenotipos, las entradas de datos se combinan para producir una representación “2D” para cada muestra: (x_i, y_i) , en la que x_i representa el resultado fenotípico, y_i el genotípico. En otra realización, las entradas de datos se combinan para producir una representación “3D” para cada muestra (x_i, y_i, z_i) , en la que x_i representa el resultado fenotípico, y_i el genotípico, y z_i otra información con respecto a la muestra, tal como un número de muestra.

15 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a cualquiera de los métodos descritos en los que una base de datos de relación de genotipos/fenotipos se usa para correlacionar la al menos una entrada de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en dicha base de datos. De acuerdo con una realización preferida, la presente invención proporciona una interpretación concienzuda y fiable de la información genotípica interrogando la parte del genotipo de una base de datos de relación de genotipos/fenotipos para patrones de mutaciones idénticos o similares a aquel de la muestra del paciente bajo estudio. Una vez que se encuentran emparejamientos, se accede a los correspondientes fenotipos, y la información fenotípica, los cambios en la IC_{50} para los diversos fármacos, se reúne y promedia para producir un perfil fenotípico. Este perfil, en una realización de la invención, puede estar basado en los datos de cientos o miles de fenotipos reales con los mismos patrones de mutaciones. En otra realización, se secuencia la región RT-PR del genoma del HIV-1 de una muestra de paciente, y la secuencia es usada en los métodos de la invención para interpretar la información del genotipo. El fenotipo virtual puede entonces usarse para diseñar una terapia, la cual puede ser uno o más fármacos. En una realización adicional, el software patentado puede usarse para interpretar la información del genotipo de acuerdo con los métodos de la invención.

25 En una realización, se puede obtener un fenotipo más exacto construyendo un patrón de mutación usando mutaciones que han sido validadas. Un experto en la técnica reconocerá que existen numerosos métodos de validación para saber si una mutación se correlaciona con la resistencia a al menos una terapia, incluyendo, pero no sin limitarse a, experimentos de fenotipo, tales como el ANTIVIROGRAM (Virco, Bélgica) y estudios clínicos (WO 97/27480).

30 En otra realización, el número y las combinaciones de mutaciones usadas para construir un patrón de mutación podría ser actualizado regularmente. Esto se puede hacer para incorporar mutaciones o combinaciones identificadas recientemente las cuales pueden mejorar el comportamiento del sistema. En otra realización, un fenotipo puede ser calculado a partir de al menos una mutación usada para construir un patrón de mutación, sin embargo, desde una perspectiva estadística, un fenotipo más exacto puede resultar de un mayor número de mutaciones. De acuerdo con una realización adicional, en cualquiera de los métodos de la invención, el fenotipo de dicha muestra biológica puede expresarse como número de veces del cambio medio en la resistencia frente a al menos una terapia, en el que dicho número de veces de cambio medio de la resistencia se calcula a partir del fenotipo o fenotipos de la base de datos de al menos una entrada de genotipo con un patrón de mutación similar. Preferiblemente, el fenotipo de dicha muestra biológica frente a al menos una terapia o agente terapéutico es expresado como una IC_{50} . Los valores IC son concentraciones inhibitorias, en la que la IC_{50} representa la concentración de un fármaco definido que produce la mitad del rendimiento de la señal comparado con un experimento de un blanco que no comprende fármacos.

35 El término “proveedor del cuidado de la salud” se entiende que incluye cualquier persona profesional autorizada o entrenada para tratar o recibir los datos del paciente y/o muestras. Tales personas incluyen pero no están limitadas a médicos, doctores, clínicos, trabajadores del cuidado de la salud, enfermeras, técnicos, personal de laboratorio, etc.

40 La Figura 10 proporciona un diagrama de flujo ejemplar para determinar un fenotipo virtual. En una realización, las diversas etapas y operaciones de la Figura 10 pueden ser llevadas a cabo por el sistema 40 de determinación del fenotipo en el entorno del sistema de la Figura 11 para evaluar la resistencia de un paciente a una terapia, o diseñar u optimizar una terapia para un paciente, por ejemplo, con HIV.

45 Como se ilustra en la Figura 10, en una realización, el proceso comienza con la obtención de al menos una secuencia genética de un paciente (etapa 100). Una secuencia genética puede obtenerse por un proveedor de cuidado de la salud, laboratorio, o cualquier otra entidad. En una realización, la al menos una secuencia genética, que incluye secuencias genéticas tomadas en varios momentos o una historia de secuencia de un paciente, se puede almacenar en una base de datos, tal como la base de datos local 46 del sistema de determinación del fenotipo 40 (véase la Figura 11).

Como parte del cálculo de un fenotipo virtual, un patrón de mutación de la secuencia genética se puede determinar (etapa 110) para al menos una terapia. Como parte de esta etapa, el sistema 40 de determinación del fenotipo puede incluir datos de mutaciones que se correlacionan con resistencia a al menos una terapia. Los datos de mutación pueden ser accedidos desde una base de datos local 46 y/o una(s) base(s) de datos pública(s) 52.

5 Una base de datos de relación de genotipos/fenotipos es entonces investigada en busca de al menos una secuencia genética similar a la secuencia genética del paciente (etapa 120). Todas las secuencias similares son identificadas. Esto se puede lograr buscando un patrón de mutación similar al patrón de mutación determinado en la etapa 110, o, por ejemplo, comparando la secuencia genética del paciente con las secuencias de la base de datos de relación de genotipos/fenotipos usando secuencias de alineamiento. La base de datos de relación de genotipos/fenotipos puede ser accedida desde una base de datos local 46 y/o 46 y/o base(s) de datos pública(s) 52.

Como se ilustra en la Figura 10, se obtiene un fenotipo de la base de datos para cada secuencia genética similar identificada a partir de la base de datos de relación de genotipos/fenotipos (etapa 130). Entonces se calcula un fenotipo para la secuencia genética del paciente a partir de todos los fenotipos de bases de datos identificados (etapa 140).

15 La información se puede transmitir entonces nuevamente al proveedor de cuidado de la salud, o puede ser usada en la determinación de otra información, tal como la evaluación de la resistencia de un paciente a una terapia, o diseñar u optimizar una terapia para un paciente. La información resultante puede entonces ser transmitida de nuevo al proveedor de cuidado de la salud. La Figura 11 es un entorno del sistema ejemplar en el cual las características y los métodos de la invención pueden ser implementados (por ejemplo, los métodos como los mostrados en la Figura 10). Como se ilustra en la Figura 11, se proporciona un canal 30 de comunicación para facilitar la transferencia de datos entre diversos componentes del sistema y entidades. Estos componentes y entidades pueden incluir, por ejemplo, uno o más proveedores de cuidado de la salud 12A-12N, quienes interactúan con o tratan pacientes (no mostrados), un sistema 40 de determinación de fenotipo, y una o más bases de datos públicas 52.

20 El canal de comunicación 30 puede ser implementado a través de cualquier canal único o combinación de canales que permiten la comunicación entre diferentes personas, ordenadores o localidades. El canal de comunicación puede ser cualquier sistema que permita la comunicación entre las diferentes entidades ilustradas en la Figura 11.

Cada uno de los proveedores de cuidado de la salud 12A-12N, por ejemplo, recoge las muestras biológicas de cada paciente o pacientes, y determina una secuencia genética, o tiene una secuencia genética determinada, en el que tal dato es sometido a análisis por el sistema 40 de determinación del fenotipo.

30 En una realización, el sistema 40 de determinación del fenotipo puede ser implementado a través de cualquier combinación adecuada de hardware, software y/o firmware. Por ejemplo el sistema 40 de determinación del fenotipo puede ser implementado a través del uso de un ordenador personal, una estación de trabajo, un servidor o cualquier plataforma informática. También se puede proporcionar software o instrucciones programadas para controlar las operaciones de la plataforma informática, consistente con los principios de esta invención. Como se ilustra en la Figura 11, el sistema 40 de determinación del fenotipo puede incluir también una base 46 de datos local para almacenar los datos del paciente, incluyendo los datos de la secuencia genética. La base de datos local 46 puede también almacenar los datos de mutación y/o datos de relación de genotipos/fenotipos, y los datos de mutación y/o datos de relación de genotipos/fenotipos pueden ser accedidos desde una o más bases de datos públicas 52 por el sistema 40 de determinación de fenotipo.

40 En consistencia con los métodos de la presente invención, el sistema 40 de determinación del fenotipo es configurado para proporcionar información relativa a al menos uno de: fenotipo, evaluación de la resistencia de un paciente a una terapia, y diseño u optimización de una terapia para pacientes tratados por los médicos 12A-12N. La información puede ser enviada por el sistema 40 a los médicos 12A-12N en numerosos formatos (por ejemplo, informes escritos, archivo electrónico, pantalla gráfica, etc.), y pueden proporcionarse a los médicos gratuitamente o como un servicio libre o auxiliar.

45 Debe entenderse que el método como se subrayó en los Ejemplos es apto para analizar el efecto de las alteraciones genéticas, y los cambios proteicos consecuentes, en el gen de proteasa y transcriptasa reversa del HIV. Debe apreciarse que el método es igualmente bien adaptable para analizar diferentes genes o grupos de genes presentes en el HIV, o cualquier otro organismo, sea de origen viral, procariótico o eucariótico, implicado en los diagnósticos clínicos o en la farmacogenética.

Descripción de las Figuras

Figura 1: El informe de la Figura 1 proporciona la siguiente información para ayudar al médico a interpretar los datos genotípicos y desarrollar un régimen de tratamiento:

1. Las primeras dos columnas dan los nombres comerciales y genéricos de los fármacos.

2. La parte superior del diagrama tiene una representación gráfica de las mutaciones en la región de la proteasa del genoma.

3. Debajo de esto está la misma información para la región de la transcriptasa reversa.

5 4. La tercera columna indica simplemente si fueron encontradas o no las mutaciones que afectan a la susceptibilidad para esa fármaco particular.

5. La cuarta columna indica el número de muestras en la base de datos que se emparejan con el patrón de mutaciones en la muestra del virus, para cada fármaco.

6. La quinta columna tiene una representación con códigos de color del rango de susceptibilidades fenotípicas encontradas en la base de datos.

10 7. Finalmente, se presenta la IC_{50} promedio para todos los emparejamientos en la base de datos para cada fármaco.

Figura 2: una predicción de un informe usando la presente invención.

Figura 3: valor predictivo de la presente invención.

Figura 4: sección del genoma del HIV cubierto por el ensayo Antivirogram[®].

15 Figura 5: representación esquemática de acuerdo con una realización de monitorización de la resistencia.

Figura 6: es un diagrama esquemático de una búsqueda del patrón ejemplar. Los números indicados para cada mutación (N) indican la N observada en el análisis de la base de datos ilustrada en la Tabla 1.

20 Figura 7: representa los resultados de la búsqueda fenotípica para el virus con diferentes agrupamientos de mutaciones de resistencia a AZT. La gráfica muestra la media (o), el error estándar (1) y límites de confianza de 95% (L) para cada agrupamiento.

Figura 8: es una correlación entre el fenotipo virtual predicho por el ordenador y el real. Se muestra un análisis de regresión lineal para cuatro conjuntos de datos aleatorios independientes que comprenden 500 muestras cada uno.

25 Figura 9 (a) y (b): son una descripción del coeficiente de probabilidades de fracaso para lograr una reducción de la carga viral por debajo de 400 copias de ARN viral/ml.

Figura 10 (a) y (b):

10 (a) es un diagrama de flujo ejemplar para determinar un fenotipo, de acuerdo con los métodos de la invención.

30 10(b) es un diagrama de flujo ejemplar de una realización para llevar a cabo las etapas 110 a 130 de la Figura 10 (a).

Figura 11: una representación ejemplar de un entorno del sistema en el cual las características y métodos de la invención pueden ser implementados.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

35 Definición de una secuencia

Una secuencia consiste en un número de nucleótidos. Los nucleótidos se representan por las letras A, C, T y G. A, C, T y G son las bases de una secuencia. Otras letras como R, Y, M etc. simbolizan una combinación de dos o más bases.

el fondo gris medio muestran los aminoácidos en la secuencia de referencia. El fondo gris claro muestra la secuencia bajo ensayo: espacios vacíos significan que el aminoácido es el mismo que en la secuencia de referencia, los aminoácidos en letra negrita y recuadrado son las mutaciones que son conocidas o sospechosas de estar asociadas con la resistencia a la terapia o fármacos.

5 En este caso, las mutaciones serían: 10I, 20R, 36I etc., en las que el número representa la posición, y la letra el aminoácido que ha mutado.

Cálculo del Fenotipo Virtual

Para calcular el Fenotipo Virtual, es necesario explicar el concepto de “secuencias similares”.

10 Para determinar la similitud entre secuencias, no se puede emparejar simplemente los nucleótidos o aminoácidos, porque no siempre se emparejan completamente. Esto es debido a un número de mutaciones no documentadas que se pueden encontrar en cualquier secuencia, y al hecho de que diferentes combinaciones de nucleótidos conducen al mismo aminoácido.

Para ser capaces de comparar, definimos puntos de anclaje, o “puntos calientes” como son llamados. Para cada fármaco, se define un número de puntos calientes, y se actualizan continuamente.

15 Ejemplo:

Fármaco A	Mutación A Mutación B Mutación C Mutación D
	Mutación E Mutación F
	Mutación G y Mutación H
	(Mutación I Mutación J) y (Mutación K Mutación L)
	Mutación M Mutación N Mutación E Mutación F
	(Mutación M Mutación N Mutación E Mutación F) y Mutación G
	Mutación O y Mutación P
	Mutación Q Mutación R Mutación F
	Mutación E y Mutación Q y Mutación G
	Mutación R

En este ejemplo, existen 10 descripciones de puntos calientes relacionadas con el fármaco en cuestión.

20 Para comparar las secuencias, se determina una lista de perfiles (un perfil por fármaco que se ensaya) para cada secuencia. El perfil se determina llevando los recuentos de los puntos calientes emparejados y no emparejados por fármaco.

En el ejemplo anterior, si una secuencia pudiera emparejar los puntos calientes 2, 5, 6, 7 y 9, la secuencia tendría un perfil para este fármaco igual a “0100111010”. Cada nuevo perfil se almacena dentro de la base de datos.

25 Se declara cada punto caliente que lleva el recuento de las secuencias que emparejan las mutaciones. Usando esta información, el sistema es capaz de recuperar todas las secuencias que tienen exactamente el mismo perfil haciendo una intersección de los conjuntos que se emparejan y restando subsiguientemente los conjuntos que no emparejan. En lugar de usar conjuntos de secuencias, los sistemas usan los correspondientes conjuntos de datos de fenotípicos; esto incrementa el comportamiento del sistema.

30 La próxima etapa es recuperar los resultados fenotípicos para esas secuencias. Varían entre ninguna y muy por encima de 20.000. En estos resultados fenotípicos, se ejecutan unos pocos cálculos, por ejemplo se puede calcular el número de veces de resistencias medias o medianas puede ser calculado:

1.

$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

5

2. Se calcula el log de la desviación estándar de todos los valores del número de veces de la resistencia: en el que n es la cantidad de determinaciones fenotípicas y x contiene los valores del número de veces de la resistencia individual.

3. Se calcula la media de todos los valores del Número de veces de la Resistencia.

4. Los valores atípicos se determinan usando un valor de 30; estos son los valores del Número de veces de la Resistencia que son mayores que (media + (3 x STD)) o menores que (media - (3 x STD)).

10

5. Se calcula el Número de veces de la Resistencia media corregida, en todos los datos menos en los valores atípicos.

Este valor corregido se da y se usa para determinar la resistencia junto con los valores de corte que corresponden a ese fármaco. Todos los valores calculados son almacenados junto con los perfiles para los que fueron calculados.

Ejemplo 2

Un ejemplo de una realización de la presente invención puede ser descrito por las siguientes etapas:

15

1. La secuencia de gag-RT-PR se introduce en un ordenador como una cadena de texto;

2. El programa de ordenador escanea la secuencia para todas las mutaciones, y “enumera” todas aquellas que son conocidas o se sospecha que juegan un papel en el desarrollo de la resistencia al fármaco;

3. Las mutaciones son enumeran entonces frente a cada uno de los fármacos para los cuales afectan la sensibilidad;

20

4. Para cada fármaco, el programa de ordenador interroga una base de datos de genotipos para muestras previas con secuencias o mutaciones iguales o similares, relacionadas con ese fármaco. Las mutaciones primarias, aquellas mutaciones iniciales que tiene un efecto discernible en la resistencia del fármaco, son buscadas primero en la base de datos individualmente. Las mutaciones secundarias, aquellas que tienen efectos sutiles en la resistencia o incremento de la aptitud viral, son buscadas en grupos. Típicamente habrá varios cientos de registros que emparejan el patrón de mutaciones para cada fármaco;

25

5. Cada vez que se encuentra un emparejamiento, por ejemplo, una muestra previa con el patrón igual o similar de mutaciones a AZT, el programa de ordenador localiza el fenotipo para esa muestra en la base de datos de fenotipos Virco, y lo almacena (expresado como un cambio en IC₅₀).

30

6. Finalmente, de nuevo para cada fármaco, el programa calcula el cambio medio en IC₅₀ de todos los ejemplos que ha encontrado, y resume la distribución de sensibilidades como el porcentaje que fueron sensibles (resistencia es improbable), intermedio (resistencia es incierta) o resistentes (resistencia es probable); y

7. El programa puede generar entonces un informe final que enumera, para cada fármaco a su vez:

A) Los nombres del fármaco.

B) Las mutaciones encontradas en el genotipo que afectan a la sensibilidad para ese fármaco.

35

C) El número de genotipos en la base de datos de Virco para el cual el dato de fenotipo está disponible.

D) La proporción de estos que fueron sensibles, intermedios o resistentes a ese fármaco.

E) La puntuación de sensibilidad media - como un cambio en la IC₅₀.

40

La invención también proporciona, en una realización, un método para evaluar la efectividad de una terapia en un paciente determinando si el fenotipo de una muestra biológica está en un intervalo terapéuticamente efectivo. Un intervalo terapéuticamente efectivo tiene en cuenta, entre otras variables, la terapia o terapias que están siendo examinadas, las características del paciente individual tales como farmacocinéticas del paciente, y resistencia del

agente que causa una enfermedad. Un experto en la técnica puede calcular un intervalo terapéuticamente efectivo usando, por ejemplo, intervalos efectivos en terapia publicados y modelos farmacocinéticos (Véase, *por ejemplo*, Solicitud de Patente Europea nº 00/203200.1, presentada en el 15 de septiembre del 2000). La invención también proporciona métodos para optimizar la terapia para un paciente y diseñar la terapia para un paciente. En una realización, el experto puede optimizar y/o diseñar una terapia comparando los fenotipos determinados usando los métodos de la invención y eligiendo la terapia o terapias que podrían ser las más efectivas para tratar un paciente.

La Figura 1 representa un informe de muestra producido usando la presente invención.

Los estudios han mostrado que el presente método inventivo es más de 90% exacto prediciendo el fenotipo real usando una base de datos de genotipos y fenotipos actual. Puesto que se añaden más datos a la base de datos, los posibilidades de encontrar grandes números de emparejamientos exactos para el patrón de mutación de un individuo podrán aumentar, y el nivel de exactitud puede ser aún mayor.

Ejemplo 3

En el caso mostrado en la Figura 2, por ejemplo, la población de virus es probable que responda a didanosina, zalcitabina y estavudina (de los NRTI), no a AZT, 3TC y posiblemente no a abacavir. Una respuesta es probable para cualquiera de los NNRTI, pero el fármaco con más probabilidad de ser efectivo es efavirenz. Los virus del paciente serán muy probablemente resistentes al inhibidor de proteasa nelfinavir, y más probablemente son sensibles a amprenavir.

La distribución de las sensibilidades de los emparejamientos de fenotipos puede generalmente capacitar al médico, independientemente de la enfermedad estudiada, para seleccionar entre los fármacos alternativos que el sistema predice que serán efectivos para minimizar las posibilidades de resistencia. Con respecto a HIV, por ejemplo, dos inhibidores de proteasa pueden tener una puntuación idéntica para el cambio predicho en la IC₅₀, sugiriendo sensibilidad, pero uno puede tener un más amplio margen de datos, incluyendo algunos ejemplos en los que había resistencia. El médico puede entonces seleccionar el fármaco sin signos de resistencia en la base de datos.

Esta puntuación de sensibilidad media es altamente predictiva del fenotipo real, y es por tanto una variable predictiva fiable de a qué fármacos responderá o no responderá el paciente en el marco clínico. Véase la figura 3.

Ejemplo 4

En otra realización, la presente invención puede usarse con ensayos de monitorización de la resistencia fenotípica, tal como ensayos recombinantes conocidos, en el manejo clínico de enfermedades que desarrollan resistencia, incluyendo el HIV y otras infecciones virales, cáncer, infecciones bacterianas, y similares. Un sistema de monitorización de resistencia particularmente útil es un ensayo recombinante conocido como el Antivirogram®. El Antivirogram® es un ensayo recombinante altamente automatizado, de alto rendimiento, de segunda generación, que puede medir la susceptibilidad, especialmente la susceptibilidad viral, para todos los fármacos disponibles, particularmente fármacos antirretrovirales (inhibidores de transcriptasa inversa e inhibidores de proteasa) al mismo tiempo. (Hertogs K, de Bethune MP, Miller V et al. Antimicrob Agents Chemother, 1998; 42 (2): 269-276).

El proceso completo puede ser dividido en tres fases: biología molecular, transfección y evaluación de susceptibilidad. El proceso se resume más abajo y en la Figura 4.

Biología Molecular

- Fragmentos de ARN viral extraídos de muestra de sangre de pacientes.
- ADN complementario (ADNc) de la secuencia gag-PR-RT, a través del codón 400 formado a través de la transcripción inversa.
- Secuencia gag-PT-RT multiplicada usando dos rondas de PCR.
- Purificación de los fragmentos de ADN.
- Creación de clon proviral de laboratorio con secuencia gag-PR-RT suprimida.
- Inserción del clon en los plásmidos bacterianos para la reproducción de grandes cantidades.

Transfección

Este es el proceso por el cual los genes son transferidos a una célula.

1. Las secuencias gag-PR-RT de la muestra del paciente y los fragmentos de plásmidos son mezclados con células MT4, CD4+.

2. Tiene lugar la electroporación: las células son sometidas a una corriente corta (milisegundos), pero fuerte, en una cubeta que produce aperturas transitorias en la membrana celular, a través de las cuales entran tanto el fragmento de ADN gag-PR-RT como el fragmento de plásmido.

5 3. En una proporción relativamente pequeña de las células, ambos fragmentos se encontraran y probablemente apoyados por una enzima celular, se recombinarán para formar un genoma completo de HIV-1, que puede ahora ser convertido en partículas de virus infecciosas.

4. El virus recombinante se hace crecer entonces en este cultivo celular durante aproximadamente 8 días, hasta que el efecto citopatogénico o CPE alcance un nivel suficiente.

10 5. El medio se centrifuga entonces para separar las células, y el sobrenadante contiene grandes cantidades de virus recombinante - la cosecha del lote de virus.

6. El virus se titula entonces para obtener una concentración conocida.

Evaluación de la susceptibilidad

En esta fase, se determina si los diferentes inhibidores de HIV-1 son aún capaces de inhibir la replicación de los virus recombinantes mencionados anteriormente.

15 1. Se colocan diferentes concentraciones de los agentes antivirales en los 384 micropocillos de un placa de ensayo de microtitulación. Se usan varios pocillos para cada concentración, y los resultados medios se usan para incrementar la fiabilidad.

2. Se añade a cada micropocillo una dilución establecida del lote de virus recombinante o del virus de control de tipo salvaje.

20 3. También se añade a cada micropocillo una dilución establecida de células MT4 que contienen un sistema de gen informador fluorescente.

4. La placa se incuba durante 3 días, tiempo durante el cual el virus recombinante se replicará en las células MT4 a menos que sea inhibido por el fármaco antiviral. La replicación dispara el gen informador, el cual produce proteínas la cuales fluorescen.

25 5. La cantidad de replicación viral a cada concentración del fármaco se mide por espectrometría computarizada, con relación a los controles de virus de tipo salvaje.

6. La susceptibilidad del virus a cada fármaco se expresa como un número de veces del cambio en la IC₅₀ con relación al virus de tipo salvaje.

30 7. Se prepara un informe que proporciona estos datos para cada fármaco con un incremento en la IC₅₀ de menos de 4 clasificado como sensible, entre 4 y 10 clasificado como intermedio, y por encima de 10 como resistente.

El proceso completo está muy automatizado y usa la robótica del estado de la técnica para asegurar la consistencia y rendimiento elevado.

35 Existe otro ensayo que permite la evaluación simultánea de la susceptibilidad a inhibidores de transcriptasa inversa e inhibidores de proteasa a gran escala: Virologic's "Phenosense" assay (Petropoulos, CJ, Parkin NT, Limilo KL, et al. Antimicrob Agents Chemother, 2000; 44(4):920-928). El ensayo puede ser descrito como sigue:

1. Se extraen fragmentos de ARN viral de la muestra de sangre del paciente.

2. El ADN complementario (ADNc) de la secuencia gag-Pr-RT para el codón 300 se forma vía transcripción inversa.

40 3. Las secuencias de transcriptasa inversa (RT) y proteasa (Pr) se multiplican usando PCR.

4. Secuencias RT-Pr de la muestra se ligan (unidas) a provirus con las secuencias RT-Pr suprimidas, y se inserta un gen indicador, luciferasa, en el gen de la cubierta del HIV-1 suprimido.

45 5. Estos vectores virales recombinantes, junto con un plásmido que porta las proteínas de cubierta del virus de la leucemia murina, se transfectan en células humanas en presencia de concentraciones variables de inhibidores de proteasa.

6. Las partículas virales que se forman se cosechan y se permite que infecten células diana durante un

segundo tiempo en presencia de diversas concentraciones de inhibidores de RT.

La susceptibilidad de las secuencias virales a inhibidores de RT e inhibidores de proteasa se calcula midiendo la actividad de la luciferasa.

Ejemplo 5

5 Se desea proporcionar a los médicos y personas que viven con enfermedades, en particular HIV/SIDA, la información más exacta, fiable y útil acerca de la enfermedad de la persona individual, para ayudarlos a tomar la decisión más informada acerca de la estrategia de tratamiento óptima y diseñar estrategias de tratamiento. Los métodos de la presente invención representados en una realización por el VircoGEN™ II, y el Antivirogram™, tienen un lugar en el manejo clínico de enfermedades, tales como HIV/SIDA. La selección de qué ensayo(s) diagnóstico a
 10 usar y cuándo hacerlo por el médico y su paciente depende de un número de diferentes factores. Las recomendaciones para ensayos de resistencia se incluyen en varias guías de tratamiento que incluyen aquellas del US Department of Health and Human Services y la International AIDS Society. Ellos no hacen ninguna recomendación de qué ensayo usar distinta de las guías DHHS que establecen que el uso de ambos ensayos es útil para las personas con historias de tratamiento complejas. El uso tanto de la fenotipado como del genotipado es
 15 generalmente considerado como el enfoque más fiable para el ensayo de la resistencia.

Algunas situaciones clínicas en las que el ensayo de la resistencia podría valioso son listadas mas abajo con alguna razón para el tipo de ensayo a usar.

La siguiente tabla da ejemplos de situaciones clínicas en las que puede ser tenido en cuenta el ensayo de la resistencia.

20

TABLA 1

Situación clínica	Ensayo/ servicio	Fundamento
Infección aguda	VircoGEN II™	En este punto existe usualmente un alto título viral, y cualquier virus mutante que ha sido transmitido puede ser detectado fácilmente
Iniciación de la terapia	VircoGEN II™	En este punto, es probable que el paciente tenga virus que sea predominantemente de tipo salvaje o tenga pocas mutaciones. Es, por lo tanto, probable que la base de datos Virco tendrá grandes números de registros de emparejamiento, y que un Virtual/ Phenotype ™ será muy fiable.
Respuesta subóptima a terapia de combinación potente	VircoGEN II™ o AMBOS	Si el régimen inicial se seleccionó en base a la información genotípica, entonces se debe realizar un Antivirogram™. Si la selección inicial se realizó sin la información de resistencia, entonces un VircoGEN II puede ser suficiente.
Fracaso del tratamiento	VircoGEN II™	De nuevo, cuando un régimen de tratamiento del paciente comienza a fallar, en la mayoría de los casos el número y complejidad de las mutaciones probablemente sean similares a las muestras ensayadas por Virco en el pasado, así que el número de emparejamientos y la capacidad de predicción del Virtual/ Phenotype ™ será alta
Fracaso de tratamientos en pacientes con historias de tratamiento muy complejas.	AMBOS	En esta situación es esencial un Antivirogram™, y la puesta en marcha de ambos ensayos sería lo mejor. Llevar a cabo ambos ensayos significa que una puede actuar como una comprobación para la otra. Esta combinación dirá cómo los virus con ese patrón de mutaciones se “comportó” en el pasado y cómo este virus particular se “comporta” en presencia de fármacos bajo condiciones de laboratorio controladas.

Cuando se introducen nuevos fármacos	AMBOS	En esta situación existe probablemente una escasez de información acerca de los patrones de mutaciones involucradas en la resistencia -un Antivirogram™ sería esencial, y lo mejor sería llevar a cabo ambos ensayos. Esto proporcionaría tanta información como fuera posible acerca de la base molecular de la resistencia al nuevo fármaco, así como informar la decisión clínica a tomar
Pocos emparejamientos para el genotipo del individuo	Antivirogram™	En una pequeña minoría de casos, un genotipo puede revelar un nuevo patrón de mutaciones, de manera que existen emparejamientos insuficientes en la base de datos de Virco para producir un Virtual/Phenotype™ estadísticamente fiable. En estos casos, se recomienda un Antivirogram.

Ejemplo 6

Fuente de muestras y análisis de susceptibilidad

- 5 Se obtuvieron muestras de plasma de pacientes, y se sometieron a laboratorios para evaluación de rutina de la susceptibilidad del fármaco. Estas se recogieron fundamentalmente de USA, Canadá y Europa, aunque muestras de América del Sur, Sudeste Asiático y Sudáfrica están también representadas en la base de datos. Debido a la naturaleza de la recogida de estas muestras, no se pudo obtener terapia e historias clínicas globales de la mayoría de los pacientes involucrados - aunque la mayoría fueron de diferentes pacientes individuales. Se extrajo ARN viral de esas muestras y se convirtieron en ADNc por transcripción inversa. Posteriormente, un fragmento de 1,7 kb del genoma del HIV-1 que abarca parte del gag, la proteasa y los primeros 400 codones de RT se amplificó mediante PCR¹. Estos amplicones se secuenciaron directamente mediante un secuenciador ABI automatizado, y el fenotipo de susceptibilidad del fármaco se determinó para 14 fármacos antirretrovirales individuales, usando un ensayo de virus recombinante. Las secuencias de texto se importaron directamente en la base de datos, como lo fueron la IC₅₀ y valores de número de veces de la resistencia para cada fármaco.

Desarrollo de la base de datos y derivación de fenotipo virtual

- La base de datos de genotipos-fenotipos se desarrolló en un entorno RAD (Desarrollo de Aplicación Rápida) usando Apple Macintosh. La programación fue en "4^a Dimensión" (4D); una base de datos de relación multi-entrelazada, gráfica, de 32 bit. La base de datos funciona actualmente en un PowerMac G4, 400 MHz, 256 MB RAM. Para los fines del análisis; el software supuso que la mezcla de aminoácido de tipo salvaje y mutante en un resto particular fue mutante. Se usó un total de 108 cambios de aminoácidos individuales diferentes en el procedimiento de búsqueda (en un total de 56 posiciones únicas). Este fue roto en 39 cambios en la proteasa y 69 en RT (32 para los inhibidores de RT no nucleósidos y 37 para los análogos de nucleósidos). Las siguientes mutaciones, agrupadas por clases de fármacos, fueron incluidas en la maquinaria de búsqueda. Los inhibidores de proteasa: 10F//R/V, 20I//M/R/T, 24I, 30N, 32I, 33F//M/V, 36I, 46I/L, 47L, 48V, 50V, 54L/M/V, 71T/V, 73A/C/S, 77I, 82A/F/S/T, 84A/V, 88D/S, 90M. Análogos de nucleósidos: 41L, 44A/D, 62A, 65R, 67N, 69D/N, inserción 69, 70R, 74V/I, 75A/I/M/T, 77L, 100I, 115F, 116Y, 118I, 151M, 181C, 184I/T/V, 208Y, 210W, 211K/Q, 215F/Y, 219E/N/Q, 333D/E. NNRTIs: 98G/S, 100I, 101E//P/Q, 103N/Q/R/S/T, 106A//L, 108I, 179D/E, 181C//V, 188C/H/L, 189I, 190A/E/S, 225H, 233V, 236L, 238T. En el momento del estudio, la base de datos comprendió ~ 45.000 muestras fenotipadas y ~ 35.000 genotipadas, de las cuales >15.000 tuvieron tanto un genotipo como un fenotipo.

Análisis DAP de muestras clínicas

- Datos de la carga viral de las muestras clínicas de 191 pacientes quienes participaron en el estudio de fenotipado prospectivo de HIV-1 VIRA 3001 fueron analizados de acuerdo al plan de análisis de datos del grupo de colaboración de resistencia internacional. Los datos fenotípicos y genotípicos completos estaban disponibles para estos pacientes, quienes recibieron un total de 635 fármacos antirretrovirales. El parámetro de análisis fue el fracaso virológico a la semana 16, definido como ARN de HIV-1 plasmático por encima de 400 copias/ml. Se usó regresión logística para modelar este parámetro. En los modelos univariados, la puntuación de la sensibilidad genotípica total (análisis de genotipo) o la puntuación de la sensibilidad fenotípica (análisis de fenotipo virtual y fenotipo real) fueron los únicos factores en el modelo. Mientras que, en los modelos multivariados, la carga viral plasmática de HIV-1 inicial y el número de nuevos fármacos en el régimen de tratamiento se añadieron como covariables extra. Para calcular la puntuación de sensibilidad genotípica, se usaron mutaciones particulares, o grupos de mutaciones, para diseñar la resistencia o susceptibilidad a cada fármaco antirretroviral en el régimen (estas fueron predefinidas por el grupo de colaboración de resistencia). Las puntuaciones de sensibilidad fenotípica tanto para los fenotipos reales como para los fenotipos virtuales se basaron en el número de veces del cambio en IC₅₀ con relación a un control de virus susceptible, de tipo salvaje. La puntuación fenotípica total fue definida como el número de fármacos

susceptibles en el régimen.

Derivación del “fenotipo virtual”

5 Primeramente, las regiones de proteasa y transcriptasa inversa (RT) del genoma de HIV-1 se secuenciaron por métodos estándares. Estas regiones codifican las enzimas seleccionadas por los fármacos antirretrovirales actuales, y las mutaciones aquí pueden conferir resistencia a los fármacos. Se identificaron las mutaciones asociadas con la resistencia presente en la secuencia, y entonces el software buscó una base de datos de relación de genotipos/fenotipos para las muestras archivadas con un patrón de mutación similar para cada fármaco (una mezcla de aminoácido de tipo salvaje y mutante es tratada como completamente mutante). Debido al tamaño sustancial de la base de datos, típicamente se encontraron cientos o miles de emparejamientos. El software entonces recuperó el dato fenotípico para cada uno de los genotipos que se emparejan fármaco por fármaco, ejecutó una transformación logarítmica y calculó el número de veces de cambio en la resistencia medio transformado.

15 Al igual que con el fenotipo real en el cual se basa, este se expresó como un número de veces de cambio en la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) comparado con un valor de 1.0 para virus tipo salvaje completamente sensibles. La Figura 6 muestra en diagrama cómo se llevó a cabo una búsqueda de este tipo, usando mutaciones que influyen en la resistencia a la zidovudina (AZT) como ejemplo. Esta ilustración es para un virus que tiene cualquier combinación de mutaciones 41 L, 184V o I y 215Y o F. Unas series de búsquedas primero encuentra todas las muestras que contienen individualmente cada una de las mutaciones, y entonces por un proceso de inclusión se identifican todas las muestras que contienen las tres mutaciones ilustradas.

20 La información correspondiente de la base de datos para estas mutaciones de resistencia específica a AZT se muestra en la Tabla 2. Esta ilustra ejemplos de las primeras 13255 muestras emparejadas genotípicamente encontradas en la base de datos para mutaciones individuales y múltiples en los codones 41, 184 y 215 de RT del HIV-1. Un número de características interesantes se indican en esta Tabla. En particular, el efecto fenotípico de una mutación depende del contexto genético en el cual se produce. En este ejemplo simple de solamente estas tres mutaciones, los virus con 41L pueden tener un incremento medio en la resistencia que oscila desde 1,3 veces a > 27 veces. Así, la simple detección de la presencia (o ausencia) de una mutación dada puede ser no informativa o incluso engañosa. Además, el efecto de las mutaciones no es simplemente aditivo - los efectos moduladores de las mutaciones M184V o I (que disminuyen la susceptibilidad a AZT) y/o la mutación 41L (que incrementa la susceptibilidad a AZT) en los virus con las mutaciones 215Y o F pueden ser discernidos de la Tabla X (intervalo de 6,2 a 27,7 veces). Este análisis es considerablemente menos sofisticado que el sistema de fenotipo virtual, ya que representa grupos de muestras en los que solamente se ha producido la inclusión de tres mutaciones específicas, en vez de inclusión adicional y exclusión de otras mutaciones.

TABLA 2. Ejemplo de Método para Derivar Fenotipos Virtuales de AZT (usando solamente tres mutaciones)

Codón 41	Codón 184	Codón 215	Fenotipo Media Geométrica	Fenotipo media (log)	Desviación Estándar (log)	N
ANY	ANY	ANY	3,9	0,59	0,78	13255
WT	WT	WT	1,3	0,12	0,38	4826
WT	WT	F/Y	13,4	1,13	0,73	695
WT	V/I	WT	1,3	0,10	0,47	2172
WT	V/I	F/Y	6,2	0,79	0,61	673
L	WT	WT	1,7	0,24	0,36	54
L	WT	F/Y	27,7	1,44	0,69	1783
L	V/I	WT	1,3	0,13	0,45	75
L	V/I	F/Y	15,2	1,18	0,69	2693

En la derivación real de un Fenotipo Virtual para AZT, se examinó un total de 18 mutaciones de esta manera.

Identificación de agrupamientos genéticos con distintos fenotipos

35 Si el proceso de búsqueda estaba funcionando apropiadamente, se debería identificar un gran serie de agrupamientos genéticos fenotípicamente distintos. Cada uno de estos debería tener fenotipos distinguibles con solamente variabilidad modesta en la susceptibilidad. Esto fue evaluado examinando los agrupamientos genéticos

formados por las combinaciones de mutaciones de AZT descritas en la Tabla 2. Además de esas mutaciones, se identificaron agrupamientos que también contenían mutaciones de resistencia a AZT adicionales (Fig 7). Las búsquedas de la base de datos se llevaron a cabo usando muestras con mutaciones de resistencia a AZT específicas, con o sin mutaciones de resistencia a 3TC, 184V o I. Los números de muestras en cada agrupamiento genético fueron como sigue: WT (tipo salvaje, susceptible), 3798; 184 (184V/I), 777; 215 (215Y/F), 175; 215 184 (215Y/F y 184V/I), 70; 2M (41L y 215Y/F), 243; 2M 184 (41L, 215Y/F y 184V/I); 186; 3M (41L, 210W y 215Y/F), 289; 3M 184 (41L, 210W, 215Y/F y 184V/I); 4M (41L, 67N, 210W y 215Y/F), 358; 4M 184 (41L, 67N, 210W, 215Y/F y 184V/I), 84.

Esto ilustra un número de puntos importantes con respecto a las búsquedas de la base de datos. Primeramente, agrupamientos genéticos diferentes tienen distintos perfiles de susceptibilidad (indicado por los valores del número de veces de la resistencia media, junto con el error estándar y 95% de intervalos de confianza). Este valores oscilan desde un nivel de susceptibilidad ligeramente reducido (virus que posee la mutación 184V) hasta un incremento de casi 100 veces, debido a múltiples mutaciones que confieren resistencia a AZT. En segundo lugar, en cada caso, la inclusión de la mutación 184 V junto con las mutaciones de resistencia a AZT, causó una reducción sustancial en la magnitud predicha de resistencia a AZT. Los datos muestran claramente que el sistema de reconocimiento del patrón puede predecir una susceptibilidad alterada debido a las interacciones de las mutaciones.

Correlación entre el fenotipo predicho y real

El fenotipo virtual se validó de muchas maneras. Primeramente, entre 2700 y 8700 muestras genotípicamente de tipo salvaje fueron ensayadas para cada fármaco. Como se anticipó, el cambio del número de veces predicho era próximo a uno para todos los fármacos examinados, con un intervalo de 0,66-1,69 veces. Luego, se investigó la relación cuantitativa entre los fenotipos predichos y fenotipos reales. Se seleccionaron aleatoriamente 5000 muestras derivadas clínicamente de USA de la base de datos de resistencia de 1999 hacia delante, y las predicciones fenotípicas obtenidas de los perfiles genotípicos para cada fármaco se compararon con fenotipos reales en 10 subconjuntos aleatorios de 500 muestras cada uno. Esto dio como resultado aproximadamente 70.000 determinaciones en total. Entonces se llevaron a cabo análisis de regresión lineal independientes en cada uno de estos conjuntos de datos (cuatro de estos análisis son mostrados en la Fig. 8). Esto mostró una buena correlación entre el fenotipo virtual (cambio del número de veces medio en valor IC_{50}) y fenotipo de susceptibilidad al fármaco real, con una pendiente media de 0,83 (intervalo de 0,81-0,85), corte de 0,05 (intervalo de 0,02-0,07) y coeficiente de correlación medio de 0,87 (intervalo de 0,86-0,89) a lo largo de diez grupos de 500 muestras clínicas.

El fenotipo virtual predice la respuesta clínica

También se evaluó el valor predictivo del fenotipo virtual. Para dirigir esto, se llevó a cabo un análisis retrospectivo de datos clínicos y virológicos del estudio clínico, VIRA 3001. Cohen, C., et al., XIII International AIDS Conference. Durban. (2000). Esto es un ensayo clínico aleatorio recientemente completado prospectivo, que demostró el efecto positivo de la información de resistencia al fármaco fenotípica en la respuesta virológica en pacientes que habían fracasado un régimen terapéutico que contenía PI.

Muestras de 191 pacientes en este estudio se volvieron a analizar para evaluar la relación entre el fenotipo virtual (de la secuencia genética) y resultados virológicos a las 16 semanas. Los valores predictivos de fenotipo, fenotipo virtual y genotipo con interpretación "basada en reglas" fueron analizados de acuerdo con un plan de análisis de datos (DAP) usado por el grupo colaborativo de resistencia internacional para el re-análisis de los ensayos clínicos. DeGruttola V., et al., *Antiviral Therapy* 5, 41-48 (2000). Este sistema de análisis comprende aproximaciones estadísticas univariadas y multivariadas, y requiere el uso de una lista de mutaciones "basadas en reglas" para la interpretación genotípica. Los resultados de este análisis son mostrados en la Fig. 9. Se usó regresión logística para modelar el parámetro del fracaso virológico en la semana 16 (definido como ARN de HIV-1 plasmático por encima de 400 copias/ml). Se usaron modelos univariados (a) o multivariados (b) para el fenotipo de susceptibilidad al fármaco (fenotipo), fenotipo virtual (virtual) o genotipo. La puntuación de la sensibilidad fenotípica (PSS) o puntuación de la sensibilidad genotípica (GSS) calculada se obtuvieron separadamente para un análisis de abandono como censurado (DAC) o abandono como fracaso (DAF). Los resultados del análisis de regresión son mostrados en la Figura 9 como una relación de posibilidades (OR) de fracaso para lograr una reducción de carga viral por debajo de 400 copias/ml, con el 95% de intervalo de confianza (CI).

En el modelo univariable, el análisis del genotipo (abandonos como censurado, DAC) fue una variable predictiva significativa de respuesta con una relación de posibilidades (OR) de 0,69 (CI=0,51-0,93), $p=0,015$ (Fig. 9a). Sin embargo, el genotipo no fue una variable predictiva significativa de respuesta en el modelo multivariable, OR=0,81 (CI=0,57-1,14), $p=0,22$ (Fig. 9b). En contraste, el fenotipo virtual fue altamente significativo en ambos modelos, usando también el análisis DAC con un corte de susceptibilidad de 4 veces para todos los fármacos en el modelo univariable, el OR=0,38 (CI=0,25-0,6), $p<0,0001$, y en el modelo multivariable el OR=0,52 (CI=0,31-0,87), $p=0,013$. Usando cortes biológicos, específicos de fármacos, recientemente definidos, el poder predictivo del fenotipo virtual fue aún más significativo. Larder, B.A. y Harrigan, P. R., Fifth International Congress on Drug Therapy in HIV infection, Glasgow (2000). El OR en el modelo univariable fue 0.39 (CI=0.26-0.58), $p<0.0001$, y en el modelo

multivariable el $OR=0,49$ ($CI=0,31-0,76$). $p=0,0014$. Los análisis DAF (abandonos como fracasos) mostraron superioridad consistente para el fenotipo predicho sobre el genotipo, aunque el nivel de significancia fue correspondientemente menor para todas las categorías.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un fenotipo virtual de HCV, que comprende:

- a) obtener una secuencia genética a partir de dicho HCV,
- 5 b) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, y en el que dicha al menos una mutación o patrón de mutación está asociado con la resistencia a al menos una terapia,
- c) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipos con un patrón de mutación similar a al menos uno de los patrones de mutación identificados en la secuencia genética en b),
- 10 d) correlacionar cada entrada de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de datos de fenotipos, y
- e) calcular el número de veces de la resistencia virtual de dicho virus a partir de todos los fenotipos de la base de datos identificados.

2. Un método de diagnóstico para evaluar la efectividad de una terapia de un paciente, que comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica procedente de un paciente,
- 15 b) obtener una secuencia genética del HCV en dicha muestra biológica,
- c) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, en el que dicha al menos una mutación o patrón de mutación está asociada con resistencia a al menos una terapia que está actualmente siendo administrada al paciente,
- d) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipos con un patrón de mutación similar a al menos uno de los patrones de mutación identificados en la secuencia genética en c),
- 20 e) correlacionar dichas entradas de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de datos de fenotipos,
- f) calcular el número de veces de la resistencia virtual de dicho virus a partir de todos los fenotipos de la base de datos identificados,
- 25 g) obtener una serie de fenotipos repitiendo las etapas b) a e) para cada terapia que está siendo actualmente administrada al paciente,
- h) evaluar la efectividad de la terapia del paciente a partir de la serie de fenotipos.

3. Un método de diagnóstico para optimizar la terapia para un paciente, que comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica de un paciente,
- 30 b) obtener una secuencia genética a partir de HCV en dicha muestra biológica,
- c) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, y en el que dicha al menos una mutación o patrón de mutación está asociada con la resistencia a al menos una terapia,
- d) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipos con un patrón de mutación similar a al menos uno de los patrones de mutación identificados en la secuencia genética en c),
- 35 e) correlacionar dichas entradas de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de datos de fenotipos,
- f) calcular el número de veces de la resistencia virtual de dicho virus a partir de todos los fenotipos de la base de datos identificados,
- 40 g) obtener una serie de fenotipos repitiendo las etapas b) a e) para un grupo de terapias, y
- h) optimizar la terapia para el paciente a partir de la serie de fenotipos.

4. Un método de diagnóstico para predecir la resistencia de HCV a la terapia, que comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica de un paciente que contiene HCV,
- b) obtener una secuencia genética a partir de dicho HCV,
- 5 c) identificar al menos un patrón de mutación en dicha secuencia genética, en el que dicha secuencia genética comprende al menos una mutación, y en el que dicha al menos una mutación o patrón de mutación está asociada con resistencia a al menos una terapia,
- d) buscar una base de datos de genotipos para entradas de genotipos con un patrón de mutación similar a al menos un patrón de mutación identificado en la secuencia genética en c),
- e) correlacionar dichas entradas de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en una base de datos de fenotipos,
- 10 f) obtener una serie de fenotipos repitiendo las etapas b) a e) para un grupo de terapias, y,
- g) predecir la resistencia del paciente a la terapia a partir de la serie de fenotipos.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho HCV se obtiene de una muestra biológica seleccionada de una muestra de sangre, una muestra de biopsia, una muestra de plasma, una muestra de saliva, una muestra de tejido, y una muestra de moco o de fluido corporal.
- 15 6. El método cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el patrón de mutación comprende al menos dos mutaciones conocidas o sospechosas de estar asociadas con resistencia a al menos una terapia.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el patrón de mutación similar se identifica alineando la secuencia genética de una célula o HCV en la muestra biológica con la secuencia genética de WT de dicha célula o HCV.
- 20 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la búsqueda de agrupamientos se usa para determinar patrones de mutación similares.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se usa una base de datos de relación de genotipos/fenotipos para correlacionar las al menos dos entradas de genotipo con un patrón de mutación similar con un fenotipo en dicha base de datos.
- 25 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fenotipo de dicha muestra biológica es (se expresa como) un número de veces del cambio medio en la resistencia a al menos una terapia, en el que dicho número de veces de la resistencia media se calcula a partir del fenotipo de la base de datos de la al menos una entrada de genotipo con un patrón de mutación similar.
- 30 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el fenotipo de la célula o HCV en dicha muestra biológica se expresa como una IC_{50} .

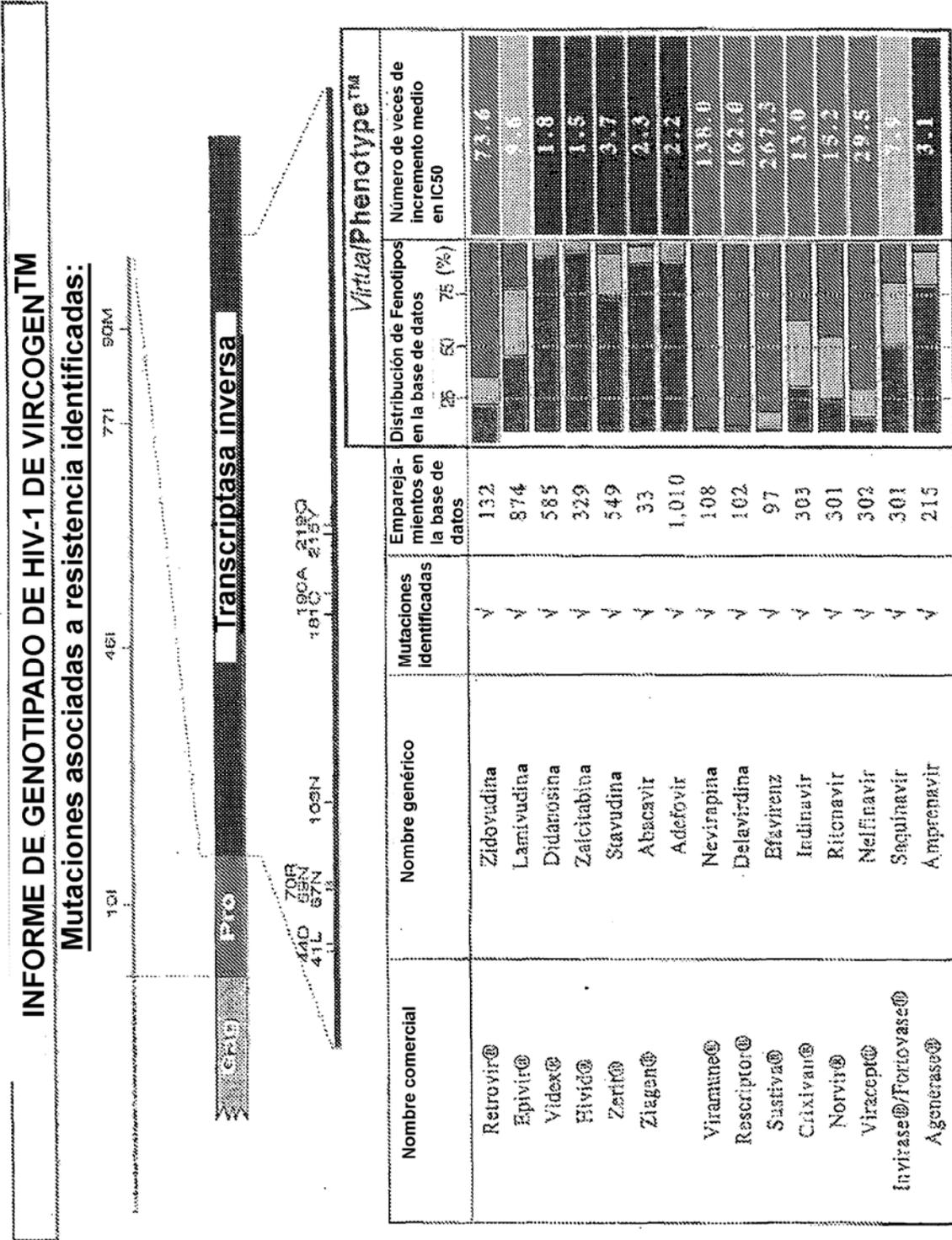


Figura 2

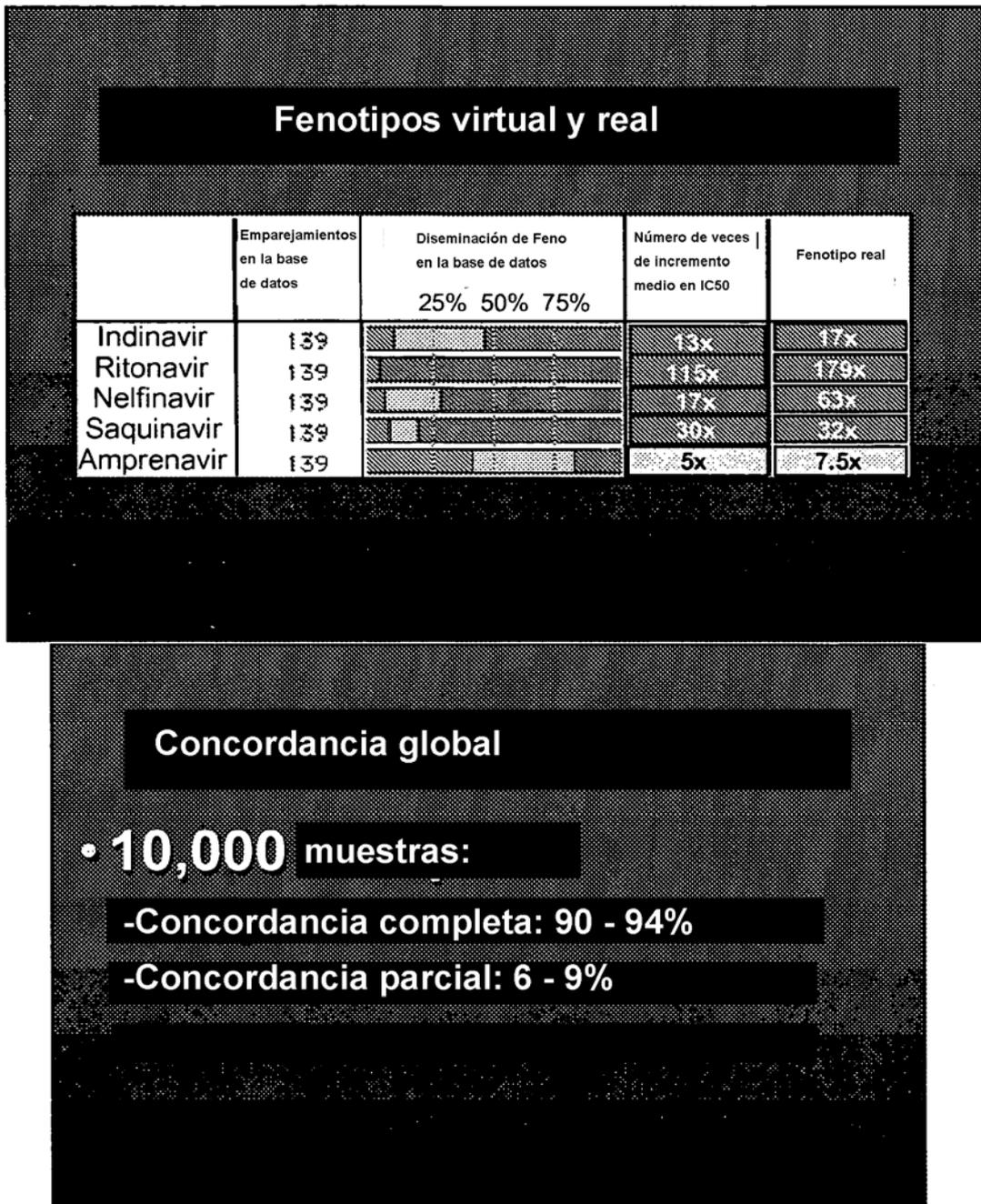


Figura 3

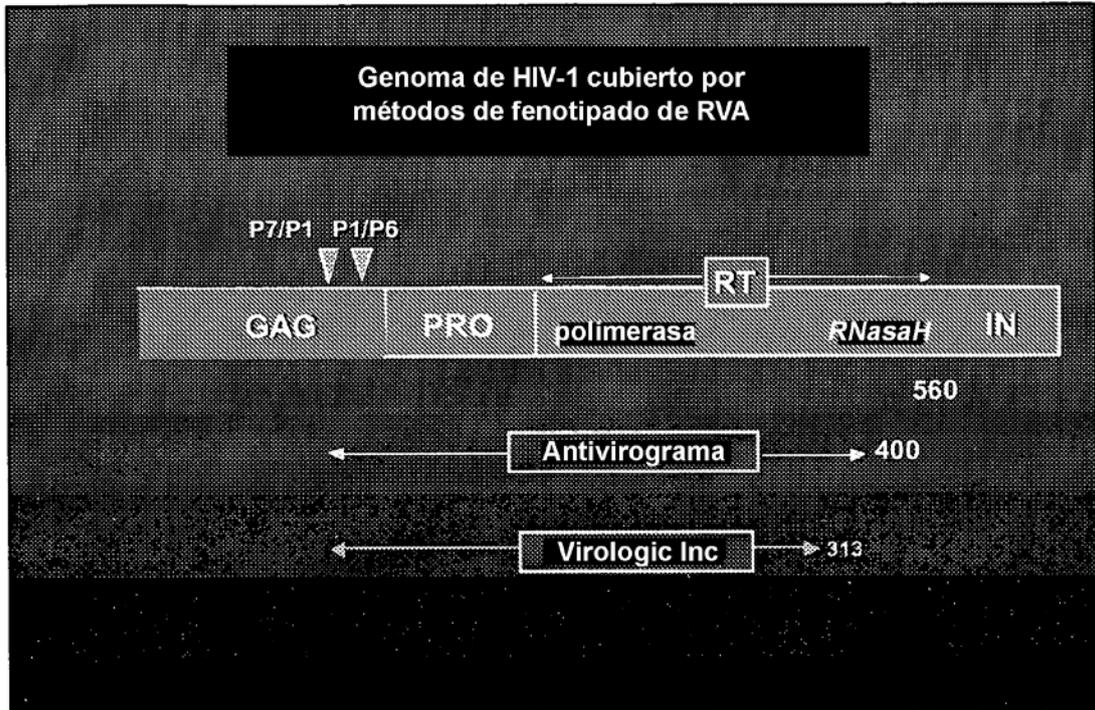


Figura 4

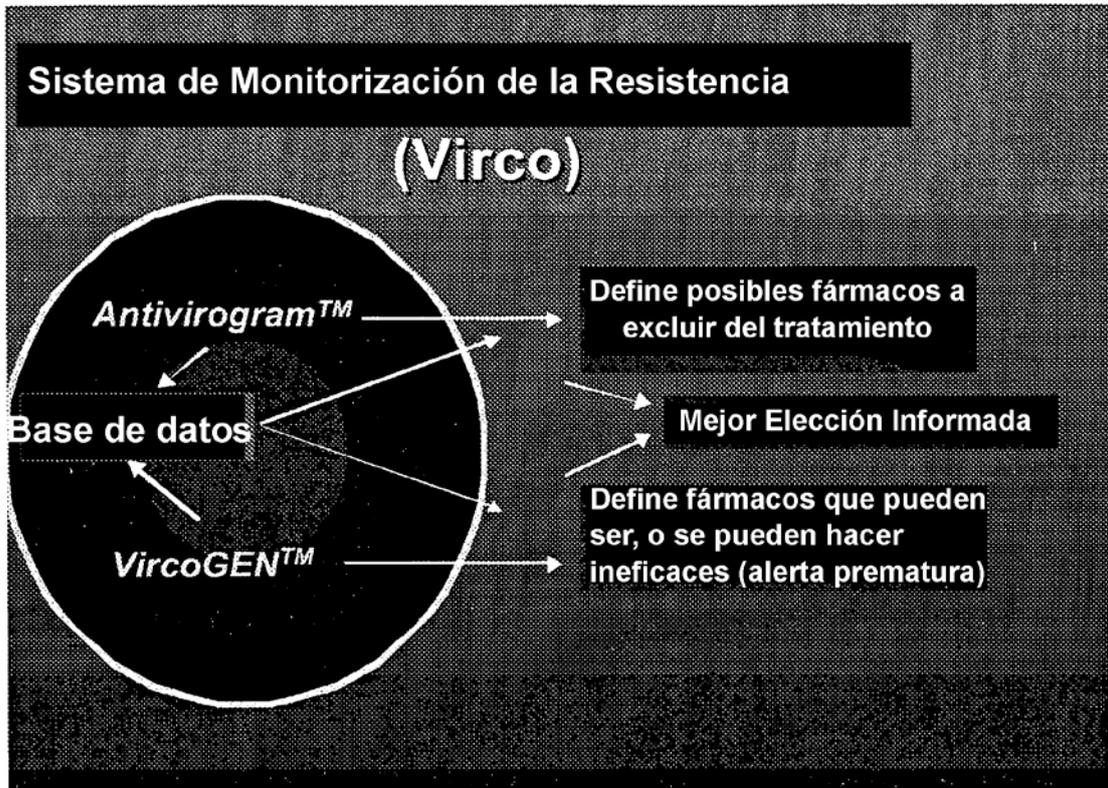


Figura 5

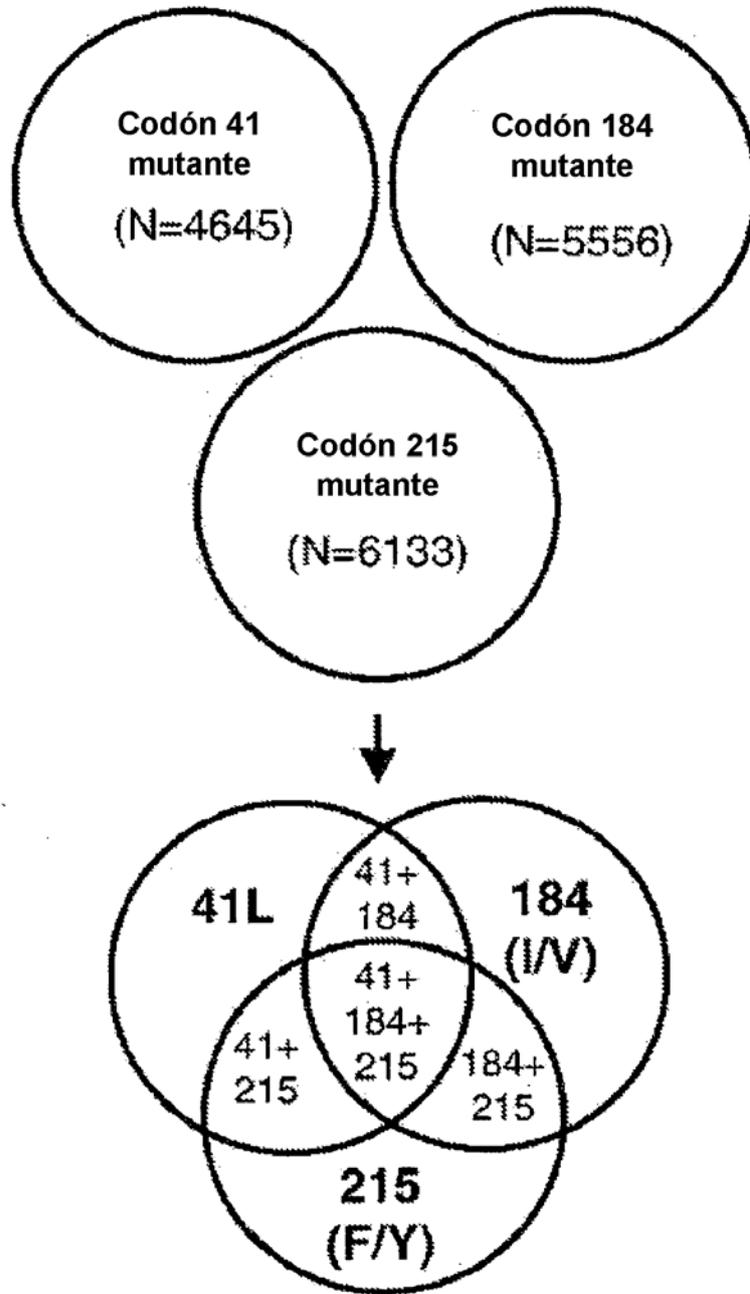


Figura 6

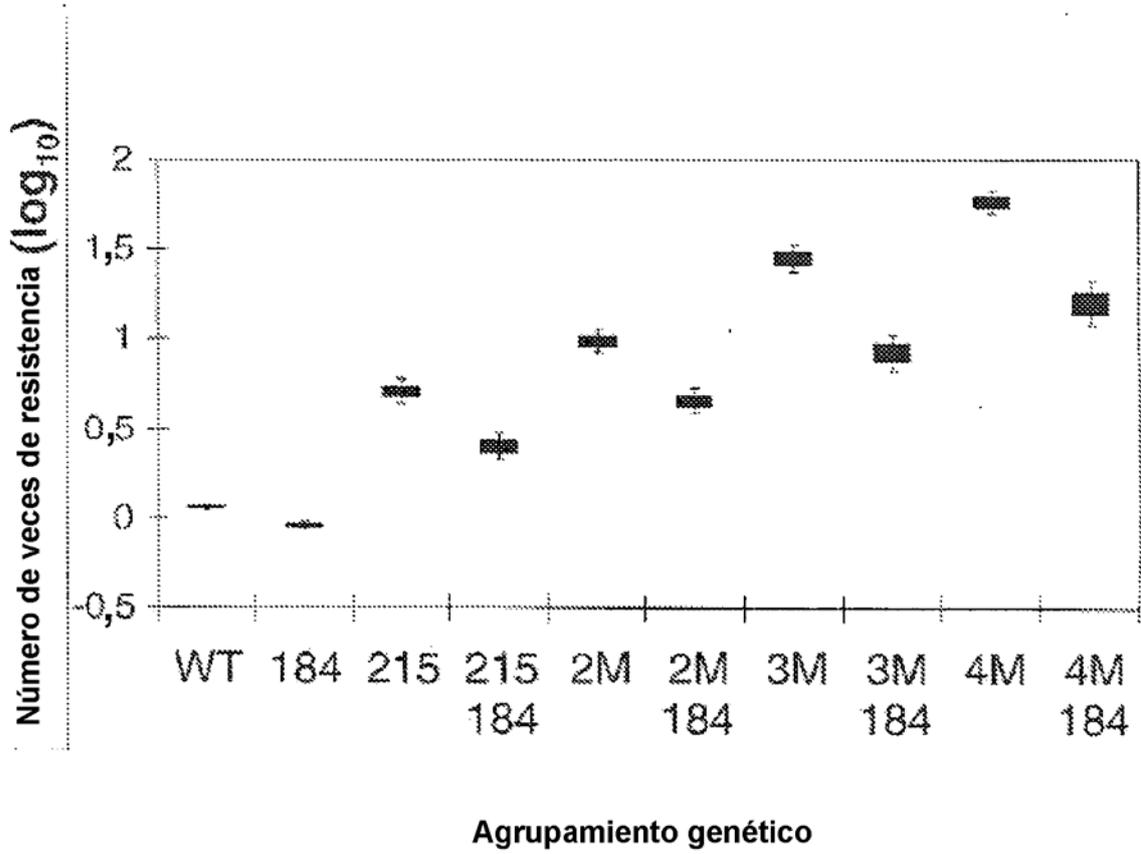


Figura 7

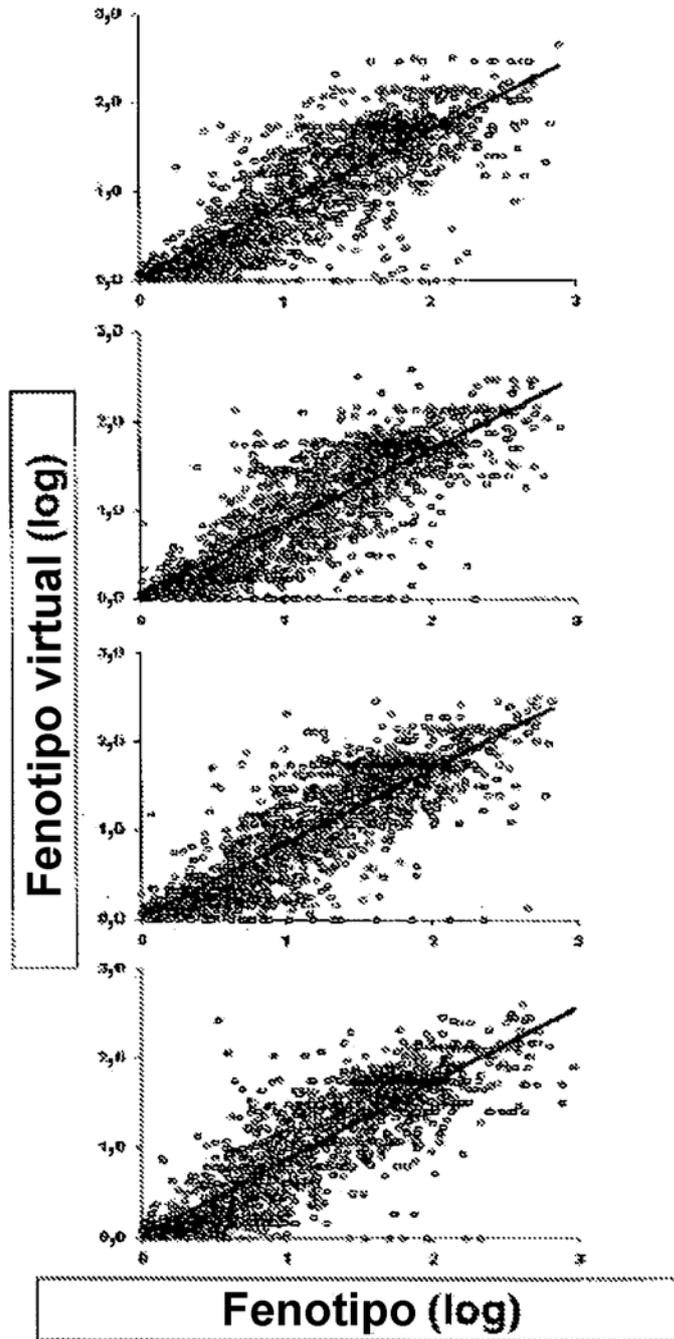


Figura 8

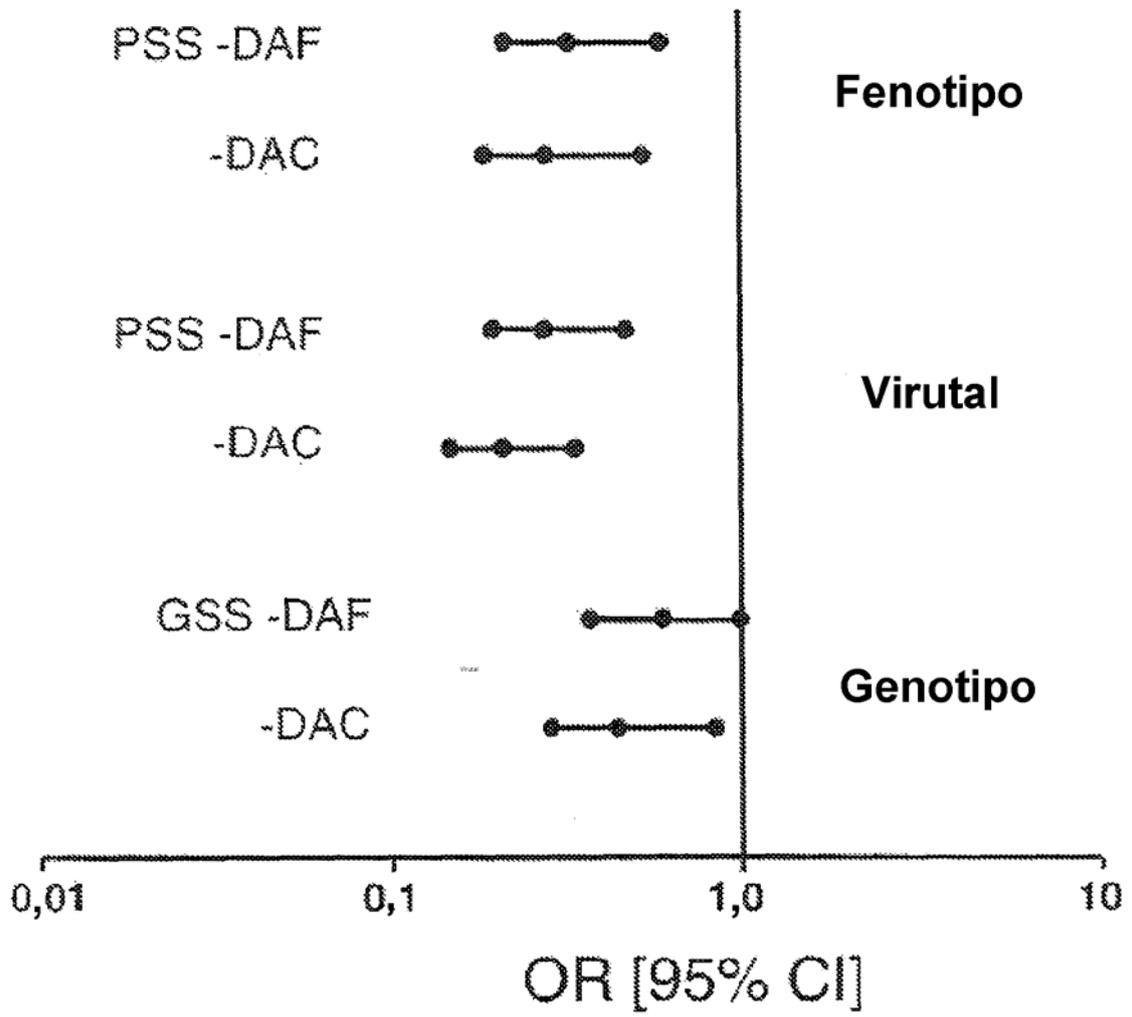


Figura 9A

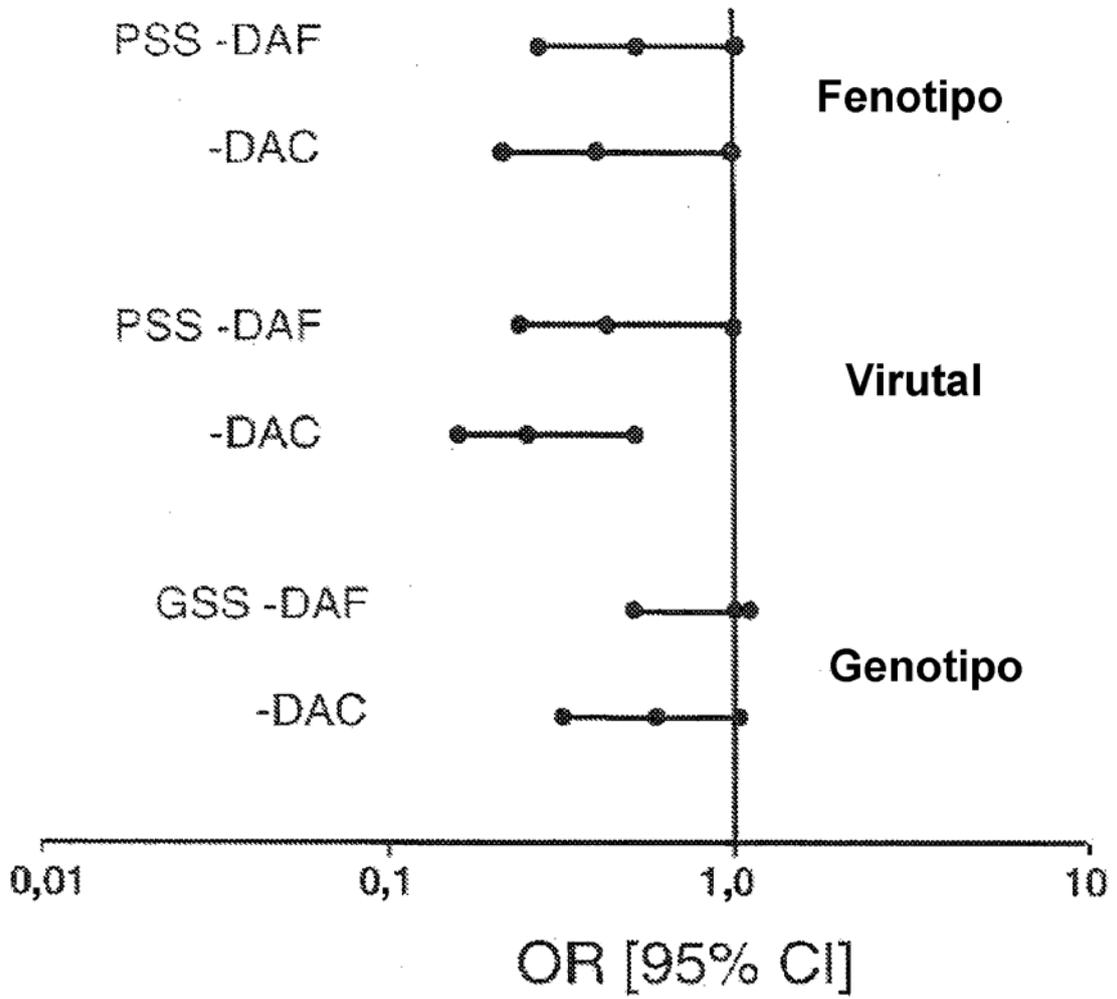


Figura 9B

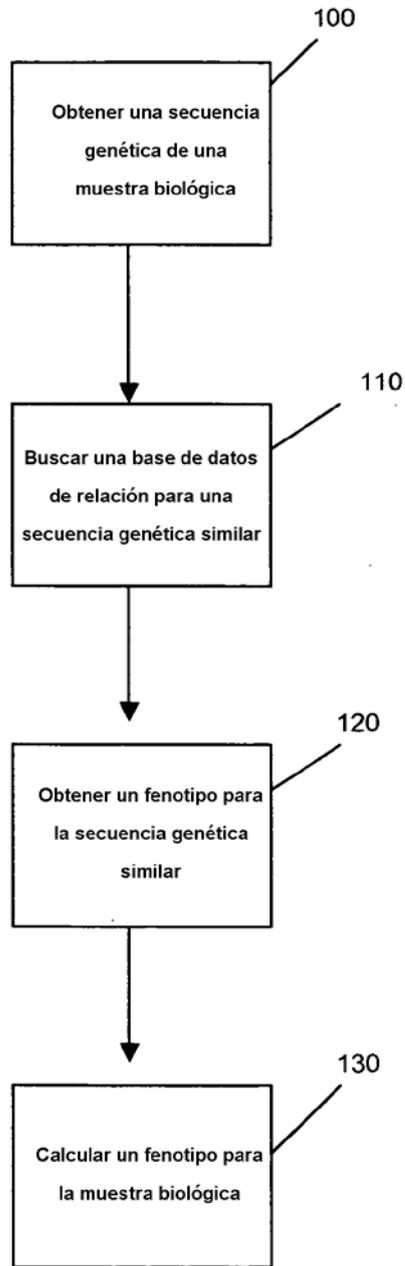


Figura 10A

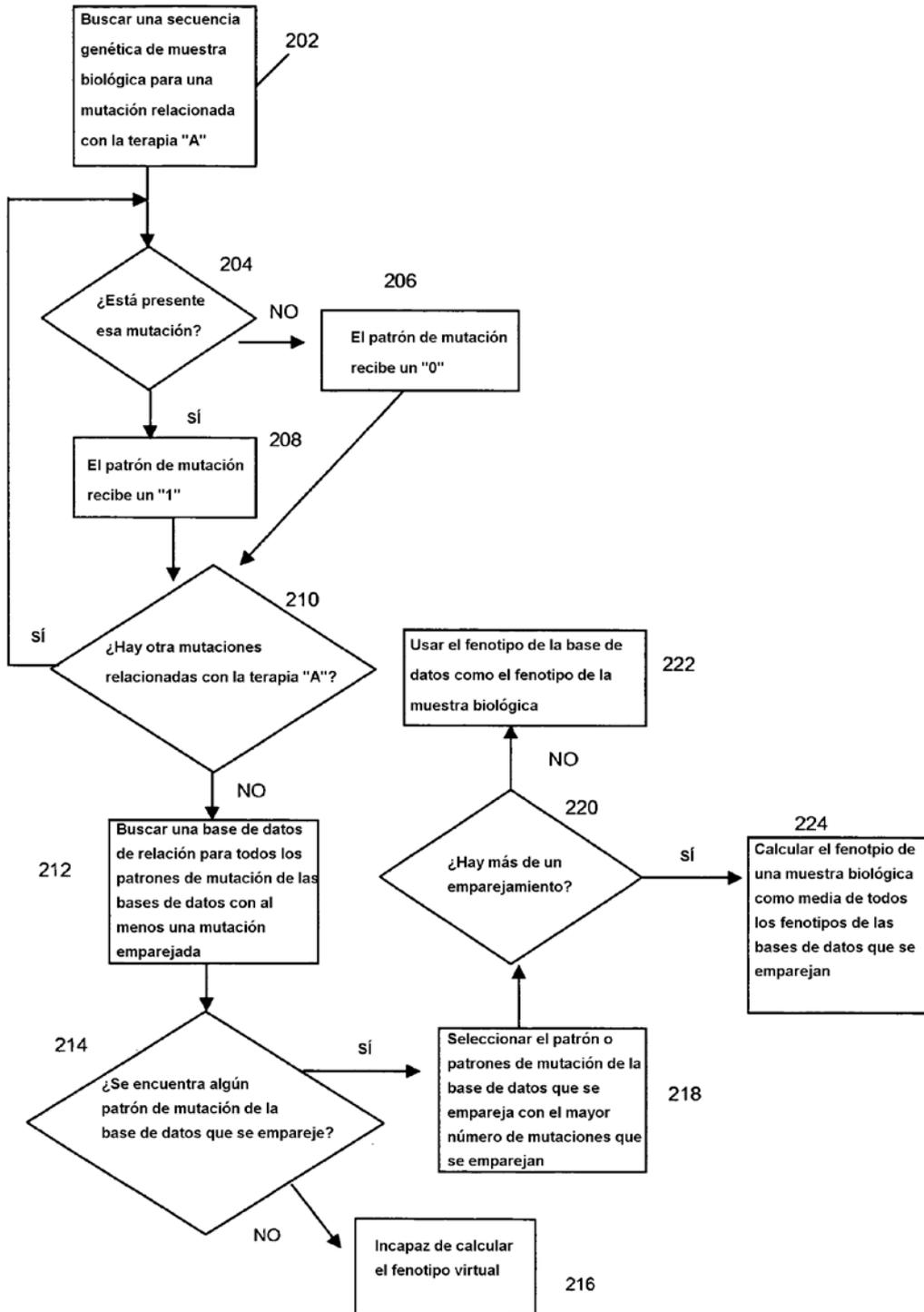


Figura 10B

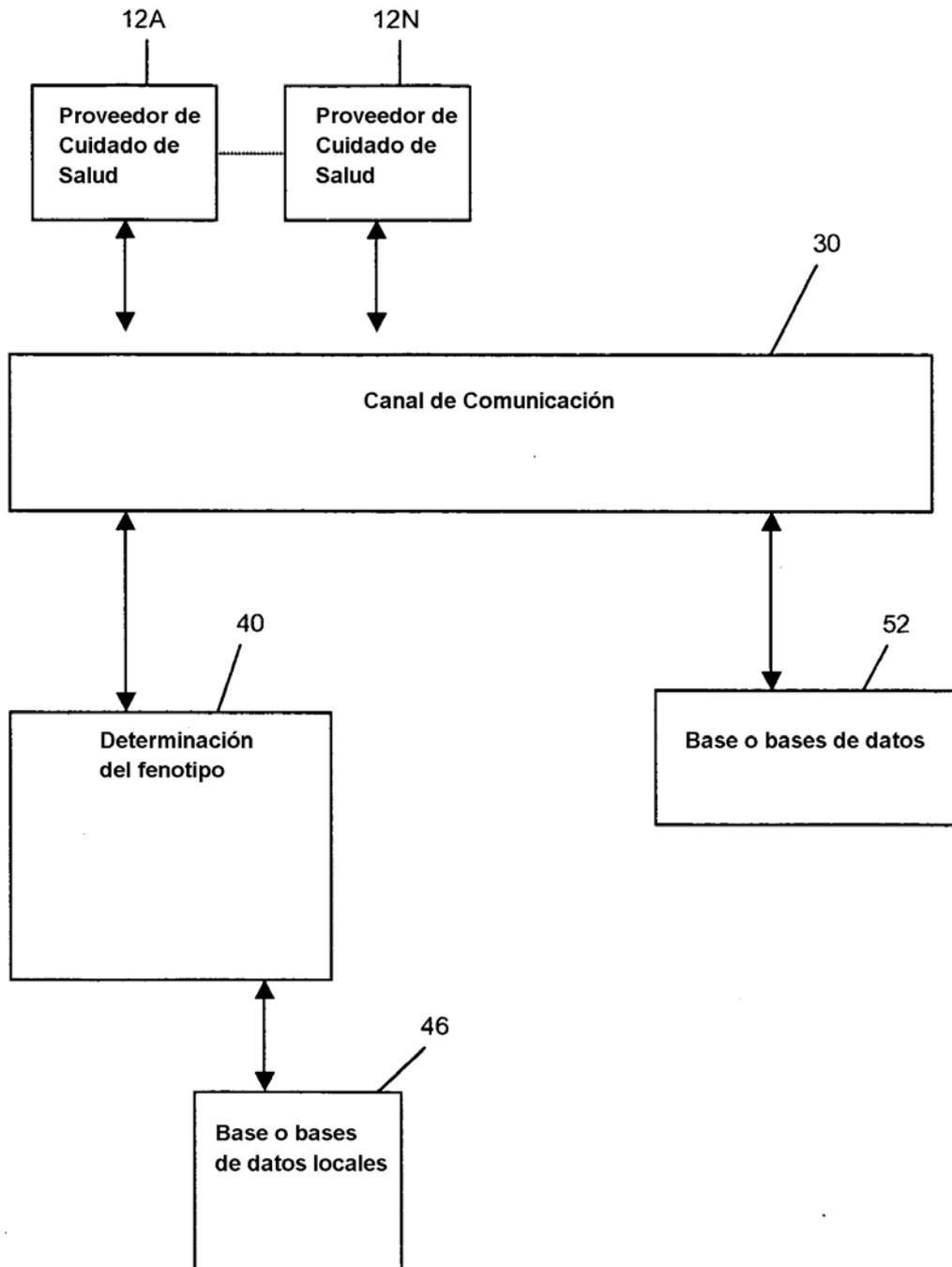


Figura 11