

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 866**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03742733 .3**
96 Fecha de presentación: **14.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1483416**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**

54 Título: **Composiciones y métodos para determinar la susceptibilidad de un virus patógeno a inhibidores de proteasa**

30 Prioridad:
15.02.2002 US 357171 P
22.02.2002 US 359342 P
26.06.2002 US 392377 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2012

73 Titular/es:
MONOGRAM BIOSCIENCES, INC.
345 OYSTER POINT BOULEVARD
SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
PARKIN, Neil, T.;
CHAPPEY, Colombe y
PETROPOULOS, Christos, J.

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 381 866 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

Composiciones y métodos para determinar la susceptibilidad de un virus patógeno a inhibidores de proteasa

1. CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a composiciones y métodos para determinar la susceptibilidad de un virus patógeno a un compuesto antiviral. Las composiciones y métodos son útiles para identificar regímenes de fármacos efectivos para el tratamiento de infecciones virales, y para identificar y determinar la efectividad biológica de compuestos terapéuticos potenciales.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Más de 60 millones de personas se han infectado con el VIH (virus de inmunodeficiencia humana) (en inglés: HIV, human immunodeficiency), que es el agente causante del sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), (en inglés: acquired immune deficiency syndrome), desde principios de los '80. Ver Lucas, 2002, Lepr Rev. 73(1):64-71. El VIH/sida es actualmente la principal causa de muerte en el África subsahariana, y es el cuarto asesino más importante a nivel mundial. Se estima que, a fines de 2001, unas 40 millones de personas estaban viviendo con VIH a nivel global. Ver Norris, 2002, Radiol Technol. 73(4):339-363.

15 Los modernos fármacos anti-VIH apuntan a diferentes etapas del ciclo de vida del VIH y a una variedad de enzimas esenciales para la replicación y/o supervivencia del VIH. Entre los fármacos que se han aprobado hasta ahora para una terapia contra el sida, se hallan los inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósidos tales como AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, abacavir, los inhibidores de transcriptasa inversa de nucleótidos tales como tenofovir, los inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos tales como nevirapina, efavirenz, delavirdine y los inhibidores de proteasa
20 tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir.

Una de las consecuencias de la acción de un fármaco antiviral es que puede ejercer una suficiente presión selectiva sobre la replicación del virus para seleccionar mutantes resistentes a los fármacos (Herrmann et al., 1977, Ann NY Acad Sci 284:632-637). Al aumentar la exposición al fármaco, la presión selectiva sobre la población de virus replicantes aumenta, de manera de promover la emergencia más rápida de mutantes resistentes a los fármacos.

25 Con la inevitable emergencia de la resistencia a los fármacos, es necesario diseñar estrategias para optimizar el tratamiento frente a las poblaciones virales resistentes. La determinación de la contribución de la resistencia a los fármacos al fracaso de los fármacos es difícil, por cuanto los pacientes que tienen una probabilidad de desarrollar una resistencia a los fármacos tienen probablemente otros factores que los predisponen a un pronóstico desfavorable (Richman, 1994, AIDS Res Hum Retroviruses 10:901-905). Además, cada paciente típicamente aloja
30 una mezcla diversa de cepas mutantes del virus con diferentes cepas mutantes que tienen diferentes susceptibilidades a los fármacos antivirales.

Las herramientas disponibles para evaluar la resistencia a los fármacos antivirales es inadecuada; los ensayos clásicos para determinar la resistencia del VIH frente a un agente antiviral son complejos, insumen tiempo, son costosos, potencialmente peligrosos y no están adaptados a medida para el tratamiento de un paciente dado. Ver Barre-Sinoussi et al., 1983, Science 220:868-871; Popovic et al., 1984, Science 224:497-500), y variaciones de ello
35 (Ver, por ejemplo, Goedert et al., 1987, JAMA 257:331-334; Allain et al., 1987, N. Engl. J. Med. 317:1114-1121; Piatak et al., 1993, Science 259:1749-1754; Urdea, 1993, Clin. Chem. 39:725-726; Kellam y Larder, 1994, Antimicrobial Agents and Chemo. 38:23-30.

40 En la actualidad, se utilizan dos enfoques generales para medir la resistencia a los fármacos antivirales. El primero de ellos, denominado ensayo fenotípico, mide directamente la susceptibilidad de los virus tomados de los virus de una persona infectada frente a fármacos antivirales particulares. Petropoulos et al., 2000, Antimicrob. Agents Chemother. 44:920-928 y Hertogs et al., 1998, Antimicrob Agents Chemother 42(2):269-76 proporcionan una descripción de ensayos fenotípicos de amplia utilización en la actualidad. Gunthard et al., 1998, AIDS Res Hum Retroviruses 14:869-76 y Schuurman et al., 1999, J Clin Microbiol. 37:2291-96 analizan los ensayos genotípicos
45 actualmente prevalentes. Hirsch et al., 2000, JAMA 283:2417-26 proveen un análisis general de los ensayos actualmente disponibles para ensayar la susceptibilidad a los fármacos.

El segundo método, denominado ensayo genotípico, detecta las mutaciones en el virus que influyen sobre la susceptibilidad al fármaco y puede asociar mutaciones genéticas específicas con la resistencia a los fármacos y el fracaso de los fármacos. Los ensayos genotípicos examinan los virus tomados de un paciente, tratando de
50 establecer la presencia de mutaciones genéticas específicas que están asociadas con la resistencia a determinados fármacos. Los ensayos genotípicos presentan algunas ventajas con respecto a los ensayos genotípicos, principalmente su relativa sencillez y la velocidad con la cual puede efectuarse el ensayo. El ensayo puede requerir tan solo unos pocos días para completarse y, por el hecho de ser menos complejo, es de una realización un tanto más económica. Sin embargo, la interpretación de los datos genotípicos depende del conocimiento previo de las relaciones entre mutaciones específicas y cambios en la susceptibilidad a las drogas.
55

Carrillo et al., 1998, J. Virol. 72:7532-41 describen la selección y caracterización in vitro de las variantes de VIH-1 y

tiene una reducida susceptibilidad al lopinavir. Se asociaron nueve mutaciones diferentes en 8 posiciones de aminoácidos con una menor susceptibilidad al lopinavir. Un estudio subsiguiente encontró 23 mutaciones diferentes en 11 posiciones en la VIH proteasa que estaban correlacionadas con la susceptibilidad in vitro al lopinavir en muestras de plasma de pacientes infectados con VIH que habían sido tratados anteriormente con por lo menos un inhibidor de proteasa (Kempf et al., 2001, J. Virol. 75:7462-69). Se postuló un algoritmo bruto que intentó correlacionar la resistencia fenotípica al lopinavir con la cantidad de mutaciones observadas en las 11 posiciones identificadas y, con ello, la efectividad del tratamiento con lopinavir (Kempf et al., 2000, Antiviral Therapy 5 (suppl. 3):70, abstract 89). De acuerdo con el algoritmo, un virus era susceptible al tratamiento con lopinavir si tenía cinco o menos mutaciones en las 11 posiciones identificadas en su proteasa. Si la cantidad de mutaciones en estas 11 posiciones era de seis o más, entonces se predijo que el virus era resistente al tratamiento con lopinavir. Id.

Los esfuerzos actuales por utilizar correlaciones genotípicas de susceptibilidad disminuida para predecir la efectividad de fármacos antivirales, especialmente fármacos dirigidos contra el VIH de continua evolución, son, en el mejor de los casos, imperfectos. Un algoritmo que pueda predecir con mayor exactitud si un fármaco antiviral dado o una combinación de fármacos serían efectivos para tratar un paciente dado permitiría ahorrar dinero y tiempo por el hecho de identificar fármacos con poca probabilidad de tener un éxito antes de ser administrados al paciente. De modo más importante, mejoraría la calidad de vida del paciente por el hecho de ahorrarle el trauma de un tratamiento con toxinas potentes que no tendrían como resultado una mejora en cuanto a su infección por VIH. Por ello, existe una necesidad urgente de un algoritmo más exacto para predecir si un fármaco particular sería efectivo para tratar a un paciente particular. Por otra parte, un ensayo a base de genotipos puede ser más rápido y más económico que los ensayos fenotípicos.

3. SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

En la presente, se revelan métodos y composiciones para desarrollar y utilizar algoritmos para determinar la efectividad de una terapia antiviral o de una combinación de terapias. Los algoritmos se basan en un análisis de datos fenotípicos y genotípicos apareados guiados por cortes clínicos fenotípicos (el punto en el cual empieza la resistencia a una terapia y termina la susceptibilidad). Los algoritmos mejoran de manera significativa la calidad de vida de un paciente por el hecho de predecir si un fármaco antiviral dado sería efectivo para tratar al paciente, ahorrándosele el trauma de un tratamiento con toxinas potentes que no tendrían como resultado una mejora de su infección por VIH.

En un aspecto, se revelan algoritmos que permiten proveer a un paciente un régimen de tratamiento efectivo por el hecho de predecir si un individuo infectado responderá al tratamiento con un agente antiviral o con una combinación de agentes, con lo que se hace posible diseñar un régimen de tratamiento efectivo sin someter al paciente a efectos secundarios innecesarios. Además, por el hecho de evitar la administración de fármacos no efectivos, se ahorra mucho tiempo y dinero.

En otro aspecto, se revelan métodos para determinar la susceptibilidad de un virus a un tratamiento antiviral, que comprende detectar, en el genoma viral o en las enzimas virales, la presencia o ausencia de mutaciones asociadas con la susceptibilidad disminuida al tratamiento antiviral.

En otro aspecto, se revelan métodos para determinar la efectividad de un tratamiento antiviral en un individuo infectado con un virus, que comprende detectar, en una muestra tomada de dicho individuo, la presencia o ausencia de mutaciones asociadas con una menor susceptibilidad al tratamiento antiviral.

La presente revelación también provee métodos para supervisar la progresión clínica de una infección viral en individuos que reciben un tratamiento antiviral, para lo cual se determina, como se describió arriba, la efectividad del mismo tratamiento antiviral o de otro.

En una forma de realización, la presente invención provee ácidos nucleicos y polipéptidos que comprenden una mutación en la proteasa de un virus de inmunodeficiencia humana ("VIH") asociado con una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen, pero sin limitación, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa es lopinavir.

En un aspecto, la invención provee un método para determinar si un virus de inmunodeficiencia humana tiene probabilidad de ser resistente o susceptible al tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende: detectar, en dicho VIH, la presencia o ausencia de dos o más de las mutaciones de proteasa de VIH enumeradas en la Tabla 7, asignar un factor de ponderación a cada mutación como se indica en la Tabla 7, y añadir dichos factores de ponderación de manera de obtener un puntaje total para dicho individuo, en donde es probable que dicho individuo tenga una resistencia al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a un puntaje de corte y es probable que dicho individuo sea susceptible al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es inferior al dicho puntaje de corte. En una forma de realización, el puntaje de corte es 6. En otra forma de realización, el puntaje de corte es 7. En otra forma de realización, el puntaje de corte es 8.

En otro aspecto, la invención provee un método para determinar si un virus de inmunodeficiencia humana tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa, que comprende: detectar, en dicho VIH, la presencia o ausencia de dos o más de las mutaciones de proteasa de VIH enumeradas en la Tabla

7; asignar un factor de ponderación a cada mutación tal como se describió en la Tabla 7; y añadir dichos factores de ponderación de manera de obtener un puntaje total para dicho VIH, en donde dicho VIH tiene una probabilidad acrecentada de ser resistente al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a un puntaje de corte. En una forma de realización, el puntaje de corte es 6. En otra forma de realización, el puntaje de corte es 7. En otra forma de realización, el puntaje de corte es 8.

En otro aspecto, la invención provee un método para determinar si un individuo infectado con un virus de inmunodeficiencia humana tiene probabilidad de ser resistente o susceptible al tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende: detectar, en una muestra tomada de dicho individuo, la presencia o ausencia de dos o más de las mutaciones de proteasa de VIH enumeradas en la Tabla 7, asignar un factor de ponderación a cada mutación como se provee en la Tabla 7, y añadir dichos factores de ponderación de manera de obtener un puntaje total para cada individuo, en donde es probable que dicho individuo sea resistente al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a un puntaje de corte y es probable que dicho individuo sea susceptible al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es inferior a dicho puntaje de corte. En una forma de realización, el puntaje de corte es 6. En otra forma de realización, el puntaje de corte es 7. En otra forma de realización, el puntaje de corte es 8.

En otro aspecto, en la presente, se revela un método para determinar si un VIH tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende detectar en la proteasa de dicho VIH o en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa, la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácidos 20, 33, 34, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 58, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, en donde la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con el inhibidor de proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea K20M, K20R, M46I, M46L, I54L, I54T, I54V, L63P, V82A, V82F, V82T, ni I84V. En una forma de realización, la mutación se detecta en la proteasa de dicho VIH. En otra forma de realización, la mutación se detecta en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa.

También se revela que la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se halla en la posición de aminoácidos 20, 33, 34, 46, 50, 54, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, con la condición que dicha mutación no sea K20M, K20R, L33F, L33M, K43T, M46I, M46L, I50V, I54A, I54L, I54M, I54S, I54T, I54V, L63P, G73A, G73S, G73T, T74S, V82A, V82F, V82I, V82S, V82T, ni I84V.

También se revela que la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se halla en la posición de aminoácidos 10, 11, 32, 47, 53, 71 ó 95 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, con la condición que dicha mutación no sea V32I ni I47V. En una forma de realización, la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en L10F, F53L y A71L.

También se revela que la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, I54A, I54M, I54S, L63T, V82S, I84A, I84L, L33F, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50L, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, I50V, I54M, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M.

En otro aspecto, en la presente, se revela un método para determinar si un individuo infectado por VIH tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende detectar, en una muestra tomada de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácidos 20, 33, 34, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 58, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, en donde la presencia de dicha mutación indica que el individuo tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con el inhibidor de proteasa, con la condición que dicha mutación no sea K20M, K20R, M46I, M46L, I54L, I54T, I54V, L63P, V82A, V82F, V82T, ni I84V. En una forma de realización, la mutación se detecta en la proteasa de dicho VIH. En otra forma de realización, la mutación se detecta en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa.

También se revela que la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se halla en la posición de aminoácidos 20, 33, 34, 46, 50, 54, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la posición de aminoácidos de la proteasa del VIH, con la condición que dicha mutación no sea K20M, K20R, L33F, L33M, K43T, M46I, M46L, I50V, I54A, I54L, I54M, I54S, I54T, I54V, L63P, G73A, G73S, G73T, T74S, V82A, V82F, V82I, V82S, V82T ni I84V.

También se revela que la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de

proteasa se halla en la posición de aminoácidos 10, 11, 32, 47, 53, 71 ó 95 de la posición de aminoácidos de la proteasa del VIH, con la condición que dicha mutación no sea V32I ni I47V. En una forma de realización, la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, F53L y A71L.

- 5 También se revela que la mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, I54A, I54M, I54S, L63T, V82S, I84A, I84L, L33F, L33I, I33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50L, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, I50V, I54M, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M.

En otra forma de realización, el virus de inmunodeficiencia humana es el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 ("VIH-1").

- 15 En otro aspecto, en la presente, se revela un oligonucleótido aislado que codifica una proteasa en un VIH que comprende una mutación en la posición de aminoácidos 20, 33, 34, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 58, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de una posición de aminoácidos de dicha proteasa en dicho virus de inmunodeficiencia humana, en donde la mutación está asociada con una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea K20M, K20R, M46I, M46L, I54L, I54T, I54V, L63P, V82A, V82F, V82T ni I84V. En una forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 nucleótidos.

- También se revela que el oligonucleótido aislado comprende una mutación asociada con una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa en la posición de aminoácidos 20, 33, 34, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 58, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de una secuencia de aminoácidos de dicha proteasa en dicho VIH con la condición que dicha mutación no sea K20M, K20R, L33F, L33M, K43T, M46I, M46L, I50V, I54A, I54L, I54M, I54S, I54T, I54V, L63P, G73A, G73S, G73T, T74S, V82A, V82F, V82I, V82S, V82T ni I84V. El oligonucleótido puede tener una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 o de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 nucleótidos.

- También se revela que el oligonucleótido aislado codifica una proteasa en un VIH que comprende una mutación en el codón 20, 33, 34, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 58, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89, en donde la mutación está asociada con una menor susceptibilidad al inhibidor de proteasa, con la condición que los codones no codifiquen M o R en la posición 20, I o L en la posición 46, L, T o V en la posición 54, P en la posición 63, A, F o T en la posición 82 o V en la posición 84. El oligonucleótido puede tener una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 o de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 nucleótidos.

- En la presente, se revela un oligonucleótido aislado que codifica una proteasa en un VIH que comprende mutaciones en el codón 20, 33, 34, 50, 54, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82 u 89, en donde la mutación está asociada con una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa, con la condición de que los codones no codifiquen M o R en la posición 20, F o M en la posición 33, I o L en la posición 46, A, L, S, T o V en la posición 54, P en la posición 63, S o T en la posición 73, S en la posición 74, A, F o T en la posición 82 o V en la posición 84. El oligonucleótido puede tener una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50, de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 o de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 nucleótidos.

En la presente, se revela un polipéptido que comprende los residuos 1-10 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 11-20 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 21-30 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 31-40 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 41-50 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 51-60 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 61-70 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 71-80 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 81-90 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 91-99 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

También se revela un polipéptido que tiene una identidad de por lo menos el 70%, pero inferior al 100% con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de por lo menos el 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de por lo menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

En una forma de realización, la invención provee un método, en donde la presencia o ausencia de una mutación en una proteasa se detecta por hibridación con una sonda de oligonucleótido específica de la secuencia con respecto a una secuencia de ácido nucleico del virus de inmunodeficiencia humana que codifica dicha mutación, en donde la presentación de la hibridación indica dicha presencia o ausencia de dicha mutación.

En otra forma de realización, la invención provee un método, en donde la presencia o ausencia de una mutación en una proteasa se detecta mediante secuenciación de ácidos nucleicos.

En una forma de realización, el individuo está experimentando o ha experimentado un tratamiento anterior con dicho inhibidor de proteasa o con otro.

En una forma de realización, el aminoácido en la posición 20 de dicha proteasa es un aminoácido que tiene una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 20 de dicha proteasa es I. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 33 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 33 de dicha proteasa es I, F o V. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 33 de dicha proteasa es I o V. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 34 de dicha proteasa es un aminoácido que tiene una cadena lateral básica, polar o hidrófila. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 34 de dicha proteasa es K. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 46 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 46 de dicha proteasa es V. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 50 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 50 de dicha proteasa es L o V. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 54 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba, no polar, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 54 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófila o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 54 de dicha proteasa es A o M. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 54 de dicha proteasa es M. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 54 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 54 de dicha proteasa es S. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 63 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 63 de dicha proteasa es T. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 66 de dicha proteasa es un aminoácido una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 66 de dicha proteasa es F o V. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 73 de dicha proteasa es un aminoácido una cadena lateral neutra, hidrófoba o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 73 de dicha proteasa es C o T. En otra forma de realización, el aminoácidos en la posición 73 de dicha proteasa es C. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 74 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba, no polar, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 74 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 74 de dicha proteasa es A o P. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 74 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 74 de dicha proteasa es S. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 76 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 76 de dicha proteasa es V. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 79 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba, no polar, ácida, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 79 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 79 de dicha proteasa es A. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 79 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 79 de dicha proteasa es D o E. En

otra forma de realización, el aminoácido en la posición 82 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 82 de dicha proteasa es S. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 84 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 84 de dicha proteasa es L. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 89 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadenas lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 89 de dicha proteasa es I o M. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 43 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 43 de dicha proteasa es T. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 48 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral neutra, hidrófoba o no polar. En otra forma de realización, e aminoácido en la posición 48 de dicha proteasa es V. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 55 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral básica, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 55 de dicha proteasa es R. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 58 de dicha proteasa es un aminoácido con una cadena lateral ácida, hidrófila o polar. En otra forma de realización, el aminoácido en la posición 58 de dicha proteasa es E.

En otro aspecto, la descripción provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19 de las posiciones de aminoácidos. En una forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en 2 o más posiciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en 3 o más posiciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad a dicho inhibidor de proteasa en 4 o más posiciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en 5 o más posiciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad a dicho inhibidor de proteasa en 6 o más posiciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en 7 o más posiciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad a dicho inhibidor de proteasa en 8 o más posiciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en 9 o más posiciones de aminoácidos.

En otro aspecto, en la presente, se revela un método para determinar si un VIH tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con un primer inhibidor de proteasa, que comprende detectar en la proteasa de dicho VIH la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con un segundo inhibidor de proteasa en la posición de aminoácidos 10, 11, 32, 33, 34, 43, 46, 47, 48, 50, 54, 58, 71, 76, 79, 82, 84 ó 95 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, en donde la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho primer inhibidor de proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea V321I, M46I, M46L, I47V, I50V, I54L, I54M, V82A, ni I84V. En una forma de realización, el primer inhibidor de proteasa es lopinavir o amprenavir. En otra forma de realización, el segundo inhibidor de proteasa es lopinavir o amprenavir.

En otro aspecto, en la presente, se revela un método para determinar si un individuo infectado con VIH tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con un primer inhibidor de proteasa, que comprende detectar, en una muestra tomada de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con una menor susceptibilidad al tratamiento con un segundo inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 11, 32, 33, 34, 43, 46, 47, 48, 50, 54, 58, 71, 76, 79, 82, 84 ó 95 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, en donde la presencia de dicha mutación indica que el individuo tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con dicho primer inhibidor de proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea V32I, M46I, M46L, I47V, I50V, I54L, I54M, V82A, ni I84V. En una forma de realización, el primer inhibidor de proteasa es lopinavir o amprenavir. En otra forma de realización, el segundo inhibidor de proteasa es lopinavir o amprenavir.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una representación esquemática de la estructura genómica del VIH-1.

La Figura 2 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH obtenidas de un conjunto de datos de entrenamiento con 2.038 pacientes en función de la cantidad de mutaciones asociadas con la resistencia en la proteasa. El “valor de corte” genotípico es 6, es decir, un VIH se define como genotípicamente resistente al lopinavir si su puntaje total es 6 o mayor y genotípicamente sensible si su puntaje total es inferior a 6.

- 5 La Figura 3 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH obtenidas en función de la cantidad de mutaciones asociadas con la resistencia en la proteasa, después de la remoción de muestras que contienen mezclas de aminoácidos en cualquiera de las posiciones asociadas con una reducida susceptibilidad al lopinavir. Aquellas muestras que contenían tanto un tipo salvaje como un mutante fueron excluidas del análisis.
- La Figura 4 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH que contienen la mutación I50V en la proteasa en función de la cantidad total de mutaciones asociadas con la resistencia en esas muestras.
- 10 La Figura 5 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH que contienen las mutaciones V82A, F, S, T o I en la proteasa en función de la cantidad total de las mutaciones asociadas con la resistencia en esas muestras.
- La Figura 6 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH que contienen las mutaciones I54A, L, M, S, T o V en la proteasa en función de la cantidad total de las mutaciones asociadas con la resistencia en esas muestras.
- 15 La Figura 7 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH en función de la cantidad de las mutaciones asociadas con la resistencia en la proteasa después de la remoción de las muestras sin ninguna mutación primaria asociada con inhibidores de proteasa y sin un cambio de X veces la IC₅₀ ("FC") mayor de dos para cualquier inhibidor de proteasa.
- 20 La Figura 8 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH en función de la cantidad de las mutaciones asociadas con la resistencia en la proteasa después de la remoción de las muestras sin ninguna mutación primaria asociada con inhibidores de proteasa y sin un cambio de X veces la IC₅₀ ("FC") mayor de dos para cualquier inhibidor de proteasa y la remoción de muestras que contienen mezclas de aminoácidos en cualquiera de las posiciones asociadas con una menor susceptibilidad al lopinavir. Solamente aquellas muestras que contenían ambos, una cepa de tipo salvaje o de referencia y un mutante fueron removidas.
- 25 La Figura 9 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH que contienen la mutación I50V en la proteasa en función de la cantidad total de mutaciones asociadas en esas muestras, después de la remoción de muestras sin ninguna mutación primaria asociada con los inhibidores de proteína y sin un cambio de X veces la IC₅₀ ("FC") mayor de dos para cualquier inhibidor de proteasa
- 30 La Figura 10 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH que contienen las mutaciones V82A, F, S, T o I en la proteasa en función de la cantidad total de mutaciones asociadas en esas muestras, después de la remoción de muestras sin ninguna mutación primaria asociada con los inhibidores de proteína y sin un cambio de X veces la IC₅₀ ("FC") mayor de dos para cualquier inhibidor de proteasa.
- 35 La Figura 11 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH que contienen las mutaciones I54A, L, M, S, T o V en la proteasa en función de la cantidad total de mutaciones asociadas en esas muestras, después de la remoción de muestras sin ninguna mutación primaria asociada con los inhibidores de proteína y sin un cambio de X veces la IC₅₀ ("FC") mayor de dos para cualquier inhibidor de proteasa.
- 40 La Figura 12A muestra la secuencia de aminoácidos de la NL4-3 VIH (Acceso a GenBank N.º AF324493) proteasa (SEQ ID NO:1)
- La Figura 12B muestra la secuencia de ácidos nucleicos para el gen de NLA-3 VIH (Acceso a GenBank N.º AF324493) proteasa (SEQ ID NO:2).
- 45 La Figura 13 muestra el efecto del aminoácido en la posición 82 sobre el cambio de X veces el lopinavir. Se muestran la mediana (línea horizontal), los percentilos 25ésimo y 75ésimo (caja), los percentilos 10ésimo y 90ésimo (patillas) y los exteriores (puntos).
- La Figura 14 muestra el efecto del aminoácido en la posición 54 sobre el cambio X veces de lopinavir. Se muestran la mediana (línea horizontal), los percentilos 25ésimo y 75ésimo (caja), los percentilos 10ésimo y 90ésimo (patillas) y los exteriores (puntos).
- 50 La Figura 15 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambio X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH obtenidas de un conjunto de datos de entrenamiento con 2.195 pacientes en función de la cantidad de mutaciones asociadas con la resistencia en la proteasa. El "valor de corte" genotípico es 8, es decir, un VIH se define como genotípicamente resistente al lopinavir si su puntaje total es 8 o mayor y genotípicamente sensible si su puntaje total es inferior a 8.

5 La Figura 16 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad al lopinavir (cambios X veces de Log lopinavir) de muestras de VIH obtenidas de un conjunto de datos de 1.099 muestras en función de la cantidad de mutaciones asociadas con la resistencia en la proteasa. El “valor de corte” genotípico es 7, es decir, un VIH se define como genotípicamente resistente al lopinavir si su puntaje total es 7 o mayor y genotípicamente sensible si su puntaje total es inferior a 7.

La Figura 17 muestra el efecto de las mutaciones en VIH con resistencia a Amprenavir (“APV”) sobre la resistencia al lopinavir. Se muestran la mediana (línea horizontal), los percentilos 25ésimo y 75ésimo (caja), los percentilos 10ésimo y 90ésimo (patillas) y los exteriores (puntos).

10 La Figura 18 muestra un gráfico de dispersión bivalente de cambio X veces de lopinavir (“log LPV”) vs. cambio X veces de amprenavir (“log APV”).

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee un método para determinar si un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa, que comprende:

15 (a) detectar, en dicho VIH, la presencia o ausencia de dos o más de más de las mutaciones de proteasa de VIH enumeradas en la Tabla 7;

(b) asignar un factor de ponderación a cada mutación provista en la Tabla 7; y

(c) adicionar dichos factores de ponderación de manera de obtener un puntaje total para dicho VIH, en donde el inhibidor de proteasa es lopinavir y en donde dicho VIH tiene una probabilidad acrecentada de ser resistente a dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a 6.

20 5.1 Abreviaturas

“LPV” es una abreviatura del inhibidor de proteasa lopinavir.

“APV” es una abreviatura del inhibidor de proteasa amprenavir.

“PI” es una abreviatura de inhibidor de proteasa.

“PT-R” y “PT-S” son abreviaturas de “fenotípicamente resistente” y “fenotípicamente sensible”, respectivamente.

25 “GT-R” y “GT-S” son abreviaturas de “genotípicamente resistente” y “genotípicamente sensible”, respectivamente.

“PCR” es una abreviatura de “polimerase chain reaction”, reacción de polimerasa en cadena.

“FC” es una abreviatura de “fold change”, “cambio X veces”.

Las notaciones de aminoácidos utilizadas en la presente para los veinte L-aminoácidos genéticamente codificados son convencionales, y son como sigue:

Aminoácido	Abreviatura de 1 letra	Abreviatura de 3 letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu

Aminoácido	Abreviatura de 1 letra	Abreviatura de 3 letras
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

A menos que se indique otra cosa, cuando las secuencias de polipéptidos se presentan como una serie de abreviaturas de una letra y/o de tres letras, las secuencias se presentan en la dirección N → C, de acuerdo con la práctica común.

5 Los aminoácidos individuales en una secuencia se representan en la presente como AN, donde A es el símbolo estándar de una letra para el aminoácido en la secuencia, y N es la posición en secuencia. Las mutaciones dentro de una secuencia de aminoácidos se representan en la presente como A₁NA₂, donde A₁ es el símbolo estándar de una letra para el aminoácido en la secuencia de proteína de referencia, A₂ es el símbolo estándar de una letra para el aminoácido en la secuencia de proteína mutada, y N es la posición en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, una mutación G25M representa un cambio de glicina a metionina en la posición de aminoácido 25. Las mutaciones también pueden presentarse en la presente como NA₂, donde N es la posición de secuencia de aminoácidos y A₂ es el símbolo estándar de una letra para el aminoácido en la secuencia de proteína mutada (por ejemplo, 25M, para un cambio del aminoácido de tipo salvaje a metionina en la posición de aminoácidos 25). Adicionalmente, también es posible representar las mutaciones en la presente como A₁N, donde A₁ es el símbolo estándar de una letra para el aminoácido en la secuencia de proteína de referencia, y N es la posición en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, G25 representa un cambio de glicina a cualquier aminoácido en la posición de aminoácido 25). Esta notación se utiliza típicamente cuando el aminoácido en la secuencia de proteína mutada es desconocido, o si el aminoácido en la secuencia de proteína mutada pudiese ser cualquier aminoácido, excepto el encontrado en la secuencia de proteína de referencia. Las posiciones de aminoácido se enumeran en base a la secuencia de longitud total de la proteína a partir de lo cual se deriva la región que abarca la mutación. Las representaciones de nucleótidos y de mutaciones de punto en las secuencias de ADN son análogas.

Las abreviaturas utilizadas en la presente a lo largo de la memoria descriptiva se refieren a ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleobases específicas, son las abreviaturas convencionales de una sola letra. Por lo tanto, cuando se hallan incluidas en un ácido nucleico, las nucleobases codificadoras de presentación natural se abrevian como sigue: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U). A menos que se especifique de otra manera, las secuencias de ácidos nucleicos de una sola cadena que se representan como una serie de abreviatura de una letra, y la cadena superior de la secuencias de doble cadena, se presentan en la dirección 5' → 3'.

5.2 Definiciones

Tal como se las utiliza en lo que sigue, las siguientes expresiones tendrán los siguientes significados:

30 A menos que se indique específica otra cosa, la expresión “mutación primaria” se refiere a una mutación que afecta el sitio activo de la enzima, es decir, en aquellas posiciones de aminoácidos que intervienen en el complejo enzima-sustrato, o que de manera reproducible aparezcan en una tanda temprana de replicación cuando se somete un virus a la presión selectiva de un agente antiviral, o que tenga un gran efecto sobre la susceptibilidad fenotípica con respecto a un agente antiviral.

35 La expresión “mutación secundaria” se refiere a una mutación que no es una mutación primaria y que contribuye a susceptibilidad disminuida o que compensa los groseros defectos impuestos por una mutación primaria.

Un “ensayo genotípico” es un ensayo que determina una secuencia genética de un organismo, de una parte de un organismo, de un gen o de una parte de un gen. Tales ensayos se llevan frecuentemente a cabo en VIH a efectos de establecer si se hallan presentes determinadas mutaciones asociadas con resistencia a fármacos.

40 Tal como se la utiliza en representa, la expresión “datos genotípicos” son datos relacionados con un genotipo de, por

ejemplo, un virus. Los ejemplos de datos genotípicos incluyen, pero sin limitación, la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de un virus, de una parte de un virus, de un gen viral, de una parte un gen viral, o la identidad de uno o más nucleótidos o residuos de aminoácidos en un ácido nucleico o proteína virales.

5 Un “ensayo fenotípico” es un ensayo que mide la sensibilidad de un virus (tal como VIH) frente a un agente antiviral específico.

La expresión “susceptibilidad” se refiere la respuesta de un virus a un fármaco particular. Un virus que tenga una susceptibilidad disminuida o reducida a un fármaco tiene una mayor resistencia o una menor sensibilidad al fármaco. Un virus que tenga una susceptibilidad incrementada, reforzada o mayor a un fármaco tiene una sensibilidad incrementada o una resistencia disminuida al fármaco.

10 La susceptibilidad fenotípica de un virus frente a un fármaco dado es un continuo. Sin embargo, es prácticamente útil definir uno o más umbrales para simplificar la interpretación de un resultado X veces particular. Para aquellos fármacos para los que se han reunido suficientes datos de resultados clínicos, es posible definir un “valor de corte clínico” como se define a continuación.

15 La expresión “valor de corte clínico” se refiere a un punto específico en el que empieza la resistencia y termina la sensibilidad. Se la define por el nivel de susceptibilidad al fármaco al cual aumenta la probabilidad para el paciente de que fracase el tratamiento con un fármaco en particular. El valor de corte es diferente para distintos agentes antivirales, como se determina en estudios clínicos. Los valores de corte clínico se determinan en ensayos clínicos mediante la evaluación de la resistencia y de los datos de los resultados. La susceptibilidad a los fármacos (fenotípica) se mide al inicio del tratamiento. La respuesta al tratamiento, tal como el cambio en la carga viral, se supervisa entre predeterminados momentos temporales a lo largo del desarrollo del tratamiento. Se correlaciona la susceptibilidad del fármaco con la respuesta al tratamiento, y se determina el valor de corte clínico mediante niveles de resistencia asociados con el fracaso del tratamiento (análisis estadístico de los resultados globales de los ensayos).

25 La expresión “ IC_n ” se refiere a la concentración inhibitoria. Es la concentración de un fármaco en la sangre del paciente o in vitro necesaria para suprimir la reproducción de un microorganismo causante de una enfermedad (tal como el VIH) en un n %. Por lo tanto, la expresión “ IC_{50} ” se refiere a la concentración de un agente antiviral a la cual la replicación del virus se inhibe en un 50% del nivel observado en ausencia del fármaco. La expresión “ IC_{50} del fármaco” se refiere a la concentración de fármaco requerida para inhibir la replicación del virus de un paciente en un 50%, y la expresión “ IC_{50} de referencia” se refiere a la concentración del fármaco requerida para inhibir la replicación de un virus de referencia o de tipo salvaje en un 50%. De manera similar, la expresión “ IC_{90} ” se refiere a la concentración de un agente antiviral a la cual se inhibe el 90% de la replicación del virus.

35 La expresión “cambio de X veces” se refiere a una comparación numérica entre la susceptibilidad de un virus del paciente al fármaco y un virus de referencia sensible al fármaco. Es la relación entre la IC_{50} del paciente y la IC_{50} de referencia sensible al fármaco, es decir, IC_{50} del paciente/ IC_{50} de referencia = Cambio de X veces (FC, Fold Change). Un cambio de X veces igual a 1,0 indica que el virus del paciente presenta el mismo grado de susceptibilidad al fármaco que el virus de referencia sensible al fármaco. Un cambio inferior a 1 indica que el virus del paciente es más sensible que el virus de referencia sensible al fármaco. Un cambio superior a 1 indica que el virus del paciente es menos susceptible que el virus de referencia sensible al fármaco. Un valor de cambio igual o superior al valor de corte clínico indica que el virus del paciente tiene una menor probabilidad de respuesta a dicho fármaco. Un cambio inferior al valor de corte clínico indica que el virus del paciente es sensible a dicho fármaco.

La expresión “Cambio X veces de Lopinavir” se refiere a la relación entre la IC_{50} del lopinavir contra el VIH de la muestra de plasma del paciente y la IC_{50} para lopinavir contra la cepa viral de referencia NL4-3 (Acceso a GenBank N.º ASF324493).

Un virus es “sensible” al lopinavir si tiene un cambio frente a lopinavir inferior a diez.

45 Un virus es “resistente” al lopinavir si tiene un cambio de lopinavir de 10 o más.

Un virus tiene una “probabilidad acrecentada de tener una susceptibilidad disminuida” a un tratamiento antiviral si el virus tiene una propiedad, por ejemplo, una mutación, que está correlacionada con una menor susceptibilidad al tratamiento antiviral. Una propiedad de un virus está correlacionada con una susceptibilidad reducida si una población de virus que tiene la propiedad es, en promedio, menos susceptible al tratamiento antiviral que una población, por demás similar, de virus que carecen de la propiedad. Por lo tanto, la correlación entre la presencia de la propiedad y la susceptibilidad disminuida no ha de ser absoluta; tampoco hay un requerimiento de que la propiedad sea necesaria (es decir, que la propiedad desempeñe un papel en la reducción de la susceptibilidad) o suficiente (es decir, que la presencia de la propiedad de por sí sea suficiente) para conferir una susceptibilidad disminuida.

55 La expresión “homología porcentual de la secuencia” se utiliza de manera intercambiable en la presente con las expresiones “% de homología” e “identidad porcentual de la secuencia” y “% de identidad”, y se refiere al nivel de identidad de secuencias de aminoácidos entre dos o más secuencias de péptidos, cuando se las alinea mediante un

programa de alineación de secuencias. Por ejemplo, tal como se utiliza en la presente, “80% de homología” significa lo mismo que una identidad de secuencia del 80% determinada mediante un algoritmo definido, y, por lo tanto, un homólogo de una secuencia dada tiene una identidad de secuencia de más del 80% sobre una longitud de la secuencia dada. Los niveles, dados a título de ejemplo, de identidad de secuencia incluyen sin limitación, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98% o más de identidad de secuencia con respecto a una secuencia dada.

Los programas de computadora dados a título de ejemplo que pueden utilizarse para determinar una identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, la serie de los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, disponibles al público en Internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Ver también Altschul et al., 1999, J. Mol. Biol. 215:403-10 (con referencia especial al ajuste por defecto publicado, es decir, los parámetros $w = 4$, $t = 17$) y Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Las búsquedas de secuencias fueron llevadas a cabo mediante el programa BLASTP cuando se evalúa una secuencia de aminoácidos dada referida a las secuencias de aminoácidos en GenBank Protein Sequences y otras bases de datos públicas. Se prefiere el programa BLASTX para buscar secuencias de aminoácidos que han sido traducidas en todos los marcos de lectura contra secuencias de aminoácidos en GenBank Protein Sequences y otras bases de datos públicas. Tanto el BLASTP como el BLASTX se hacen correr mediante parámetros por defecto de una penalización de brecha abierta de 11,0, y una penalización de brecha ampliada de 1,0, y utilizándose la matriz BLOSUM-62. Ver Altschul, et al., 1997.

Una alineación preferida de secuencias seleccionadas a efectos de determinar la “identidad porcentual”, se lleva a cabo utilizando, por ejemplo, el programa CLUSTAL-W en la versión 6.5 de Mac Vector, operado con parámetros por defecto, que incluyen una penalización de brecha abierta de 10,0, una penalización de brecha ampliada de 0,1, y una matriz de similitud BLOSUM 30.

La expresión “aminoácido polar” se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está no cargado a pH fisiológico, pero que tiene por lo menos un enlace en el que el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene más cerca por uno de los átomos. Los aminoácidos polares genéticamente codificados incluyen Asn (N), Gln (Q) Ser (S) y Thr (T).

La expresión “aminoácido no polar” se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral que está sin carga a pH fisiológico y que tiene enlaces en los que el par de electrones compartidos en común por dos átomos es por lo general mantenido de igual manera por cada uno de los dos átomos (es decir, la cadena lateral no es polar). Los aminoácidos genéticamente codificados incluyen Ala (A), Gly (G), Ile (I), Leu (L), Met (M) y Val (V).

La expresión “aminoácido hidrófilo” se refiere a un aminoácido que presenta una hidrofobicidad inferior a cero en la escala de hidrofobicidad de consenso estandarizada de Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrófilos genéticamente codificados incluyen Arg (R), Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q), His (H), Lys (K), Ser (S) y Thr (T).

La expresión “aminoácido hidrófobo” se refiere a un aminoácido que presenta una hidrofobicidad superior a cero en la escala de hidrofobicidad de consenso estandarizada de Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrófobos genéticamente codificados incluyen Ala (A), Gly (G), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Pro (P), Trp (W), Tyr (Y) y Val (V).

La expresión “aminoácido ácido” se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de cadena lateral pK inferior a 7. Típicamente los aminoácidos ácidos tienen cadenas laterales cargados negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Los aminoácidos ácidos genéticamente codificados incluyen Asp (D) y Glu (E).

La expresión “aminoácido básico” se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de cadena lateral pK superior a 7. Típicamente los aminoácidos básicos tienen cadenas laterales de carga positiva a pH fisiológico debido a asociación con ion hidronio. Los aminoácidos básicos genéticamente codificados incluyen Arg (R), His (H) y Lys (K).

Una “mutación” es un cambio en una secuencia de aminoácidos o en una correspondiente secuencia de ácido nucleico con referencia a un ácido nucleico o proteína de referencia. Para las formas de realización de la invención que comprenden proteasa de VIH, la proteasa de referencia es la proteasa presente en NLA-3 VIH (Acceso a GenBank N.º AF324493). Si bien la secuencia de aminoácidos de un péptido puede determinarse directamente mediante, por ejemplo, la degradación de Edman o espectroscopia de masa, más típicamente, la secuencia amino de un péptido se infiere a partir de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica el péptido. Puede utilizarse cualquier método para determinar la secuencia de un ácido nucleico conocido en la técnica, por ejemplo, la secuenciación de Maxam-Gilbert (Maxam et al., 1980, Methods in Enzymology 65:499), secuenciación de didesoxi (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463) o enfoques basados en la hibridación (ver, por ejemplo, Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY).

Una “mutación asociada a resistencia” (RAM, resistance-associated mutation) en un virus es una mutación correlacionada con una menor susceptibilidad del virus a agentes antivirales. Es posible hallar una RAM en varios virus, lo que incluye sin limitación un VIH (virus de inmunodeficiencia humana). Dichas mutaciones pueden hallarse

en una o más de las proteínas virales, por ejemplo, en la proteasa, integrasa, transcriptasa de envuelta o inversa de VIH. Se define una RAM con respecto a una cepa de referencia. Para formas de realización de la invención que comprenden proteasa de HIV, la proteasa de referencia es la proteasa presente en NL4-3 HIV (Acceso a GenBank N.º AF324493).

- 5 Un “mutante” es un virus, gen o proteína que tiene una secuencia que tiene uno o más cambios con respecto a un virus, gen o proteína de referencia.

Las expresiones “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se utilizan de manera indistinta en la memoria descriptiva.

La expresión “referencia” y “tipo salvaje” se utilizan de manera indistinta en la memoria descriptiva.

- 10 Las expresiones “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “ácido nucleico” se utilizan de manera indistinta en la memoria descriptiva.

La expresión “aproximadamente” se refiere a números que están 10% por arriba o 10% por debajo del número que están modificando. En casos en los que el número debe ser un número entero, por ejemplo, la longitud de ácido nucleico o la longitud de aminoácido, si el número resultante no es un número entero, entonces se lo redondea hacia arriba o hacia abajo hasta el siguiente número entero mayor que cero.

15 **5.3. Mutaciones asociadas con la resistencia**

- La presente invención provee ácidos nucleicos y polipéptidos que comprenden una mutación en la proteasa de VIH. Es preferible que el VIH sea el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). El VIH también puede ser, por ejemplo, el VIH (virus de inmunodeficiencia humana) de tipo 2 (VIH-2). En una forma de realización, la mutación está asociada con una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, la mutación está asociada con una mayor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa. El inhibidor de proteasa puede ser cualquier inhibidor de proteasa conocido del experto en la técnica. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen, pero sin limitación, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir.
- 20

- En un aspecto, en la presente se revelan péptidos, polipéptidos o proteínas que comprenden una mutación en la proteasa de VIH asociada con una susceptibilidad, reducida o incrementada, a un inhibidor de proteasa, por ejemplo, lopinavir. En una forma de realización, la invención provee un polipéptido derivado de la proteasa de HIV y que comprende una mutación asociada con una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, el polipéptido comprende más de una mutación asociada con una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, el polipéptido comprende una mutación asociada con una susceptibilidad incrementada a un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, el polipéptido comprende más de una mutación asociada con una susceptibilidad incrementada a un inhibidor de proteasa. Los polipéptidos de la invención incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas que han sido modificados o derivados a partir de estos polipéptidos. En una forma de realización, el polipéptido comprende modificaciones postraducción. En otra forma de realización, el polipéptido comprende uno o más análogos de aminoácidos.
- 25
- 30

- En una forma de realización, el polipéptido comprende una o más mutaciones asociadas con una menor susceptibilidad al lopinavir. La Tabla 1 proporciona una lista de mutaciones asociadas con una menor susceptibilidad al lopinavir. Las posiciones de aminoácidos o de ácidos nucleicos a las que se hace referencia en este documento se refieren a las posiciones de aminoácidos o de ácido nucleico de proteasa en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente, o a la correspondientes posiciones en otros virus, por ejemplo, aquellos con adiciones o supresiones en la proteasa y el gen que codifica la proteasa con respecto a las secuencias en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 35
- 40

- En otra forma de realización, la invención provee un polipéptido derivado de la proteasa de VIH y que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, I54A, I54M, I54S, L63T, V82S, I84A, I84L, L33F, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: L33F, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50L, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I54M, L63T, V82S, I84A, L84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, L63T, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M.
- 45
- 50

- En una forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, excepto porque la secuencia difiere de la de SEQ ID NO: 1 por el hecho de contener por lo menos una mutación asociada con una susceptibilidad, reducida o incrementada, a un inhibidor de proteasa, por ejemplo, lopinavir. En otras formas de realización, un polipéptido de este tipo incluye por lo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 ó 95 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1.
- 55

En otra forma de realización, un polipéptido de este tipo comprende los residuos 1-10 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 11-20 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 21-30 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 31-40 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 41-50 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 51-60 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 61-70 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 71-80 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 81-90 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido comprende los residuos 91-99 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.

En otra forma de realización, el polipéptido tiene una identidad de por lo menos el 70%, pero inferior al 100%, con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En otra forma de realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad superior al 80% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad superior al 90% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.

Para determinar la identidad porcentual de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, se alinean las secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, es posible introducir brechas en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Seguidamente se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo aminoácido o nucleótido que la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en dicha posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias (% de identidad = # de posiciones idéntica/# total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En una forma de realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias puede llevarse a cabo mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo, no limitante, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado según Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo ha sido incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos mediante el BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas con un núcleo de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con brechas para fines de comparación, es posible utilizar el BLAST con brechas como se describen Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Como alternativa, es posible utilizar el PSI-BLAST para una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Id. Cuando se utilicen programas de BLAST, BLAST con brecha y PSI-Blast, es posible utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo preferido no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Un algoritmo de este tipo ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias de CGC. Cuando se utilice el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, es posible utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12, y unas penalización de brecha de 4. En la técnica, se conocen algoritmos adicionales, y ellos incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Dentro del FASTA, ktup es una opción de control que ajusta la susceptibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias sometidas a comparación buscando pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados individuales. El ktup puede ser ajustado en 2 ó 1 para secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El defecto si no se especifica ktup es de 2 para proteínas y 6 para ADN.

La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse mediante técnicas similares a las anteriormente descritas, permitiéndose brechas o no. En el cálculo de la identidad porcentual, típicamente se cuentan concordancias exactas.

En otra forma de realización, la presente invención provee variantes alélicas de presentación natural o de diseño sintético de los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, la presente invención provee polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que es una variante alélica de presentación natural o de diseño sintético de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 o un complemento de ellos, con la salvedad de que el polipéptido difiere del codificado por la SEQ ID NO: 2 por el hecho de contener por lo menos una mutación asociada con una susceptibilidad, reducida o incrementada, a un inhibidor de proteasa, por ejemplo, el lopinavir.

En otro aspecto, la presente invención provee polinucleótidos, oligonucleótidos o ácidos nucleicos que codifican o se relacionan con un polipéptido de la invención o con una porción biológicamente activa de él, lo que incluye, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para identificar, analizar, mutar o amplificar los ácidos nucleicos de la invención.

5 En una forma de realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una mutación en la proteasa de VIH asociada con una susceptibilidad, reducida o incrementada, a un inhibidor de proteasa, por ejemplo, lopinavir. En una forma de realización, la invención provee un ácido nucleico que codifica un polipéptido derivado de la proteasa de VIH y que comprende una o más mutaciones asociadas con una menor susceptibilidad con respecto a un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, le ácido nucleico codifica un polipéptido que incluye una o
10 más mutaciones asociadas con una susceptibilidad incrementada con respecto a un inhibidor de proteasa. Los ácidos nucleicos revelados en la presente incluyen ácidos nucleicos, polinucleótidos y oligonucleótidos que han sido modificados o derivados a partir de estas secuencias de ácido nucleico. En una forma de realización, el ácido nucleico comprende análogos de ácidos nucleicos.

15 En una forma de realización, el ácido nucleico puede tener la longitud de un genoma de VIH, es decir, de aproximadamente 9.200 nucleótidos. En otra forma de realización, el ácido nucleico puede tener la longitud de aproximadamente un secuencia codificadora de proteasa de VIH, por ejemplo, de aproximadamente 300 nucleótidos. En otras formas de realización, el ácido nucleico puede corresponder a un fragmento de una secuencia de codificación de proteasa de VIH. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener una longitud de aproximadamente
20 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 125, 150, 175, 200, 250 ó 300 nucleótidos. Como alternativa, el ácido nucleico puede tener una longitud de aproximadamente 350, 375, 400, 425, 450, 475 ó 500 nucleótidos. El ácido nucleico puede tener una longitud inferior a por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 13, 18, 19, 20,
25 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500 ó 9000 nucleótidos. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico tiene una longitud y una secuencia adecuada para detectar una mutación descrita en la presente, por ejemplo, como una sonda o cebador.

30 En una forma de realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende unas o más mutaciones asociadas con una menor susceptibilidad al lopinavir. En la Tabla 1 se provee una lista de mutaciones asociadas con una menor susceptibilidad al lopinavir.

35 En otra forma de realización, la invención provee un ácido nucleico que codifica un polipéptido derivados de la proteasa de VIH y que comprende una mutación seleccionada del grupo de mutaciones que consiste en: K20I, M46V, I54A, I54M, I54S, L63T, V82S, I84A, I84L, L33F, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50L, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: L33F, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50L, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I54M, L63T, V82S, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, L63T, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: E34D, E34K, E34Q, I50L, I50V, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M.

45 En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, con la salvedad de que la secuencia difiere de la SEQ ID NO: 2 en el hecho de que codifica por lo menos una mutación asociada con una susceptibilidad, reducida o incrementada, a un inhibidor de proteasa, por ejemplo, lopinavir. En otras formas de realización, un oligonucleótido de este tipo incluye por lo menos 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20,
50 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 150, 180, 210, 240, 255, 270 ó 285 ácidos nucleicos contiguos de la SEQ ID NO: 2.

55 En otra forma de realización, un oligonucleótido de este tipo comprende los residuos 1-30 de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 31-60 de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 61-90 de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 91-120 de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 121-150 de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 151-180 de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 181-210 de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 211-
60 240 de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido comprende los residuos 241-270 de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:2. En otra forma de

realización, el oligonucleótido comprende los residuos 271-297 de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:2.

En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una identidad de por lo menos el 60%, pero inferior al 100%, con el nucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico cuya identidad es mayor del 70% con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico cuya identidad es superior al 80% con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, el oligonucleótido tiene una secuencia de ácido nucleico cuya identidad es mayor del 90% con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2. La identidad porcentual de dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse como se describe en lo que precede.

Además de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, los expertos en la técnica comprenderán que, dentro de una población (por ejemplo, la población humana), pueden existir polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos. Dichos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población, debido a la variación alélica natural. Las variaciones alélicas naturales pueden típicamente resultar en una varianza del 1-5% en la secuencia de nucleótidos de un gen dado. Cualquiera, y la totalidad de tales variaciones de nucleótidos y las variaciones de aminoácidos resultantes que sean el resultado de una variación alélica natural y que no alteren la actividad funcional están destinados a recaer dentro de los alcances de la invención.

En otra forma de realización, la presente invención provee moléculas de ácido nucleico que son adecuadas para su uso como cebadores o como sondas de hibridación para la detección de secuencias de ácido nucleico de la invención. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender solamente una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa de la invención por ejemplo, un fragmento que pueda ser utilizado como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de la invención. La sonda puede comprender un grupo etiquetado fijado a ella, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor de enzima. En diversas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser modificadas en la parte de la base, parte de azúcar o medula espinal fosfato.

5.4. Hallar las mutaciones virales asociadas con la resistencia a los fármacos

En otro aspecto, la presente invención provee métodos para hallar una mutación asociada con la resistencia, en un virus o en un derivado de un virus.

5.4.1. El virus y muestras virales

Como se revela en la presente, una RAM (resistance-associated mutation, mutación asociada con resistencia) puede estar presente en cualquier forma de virus, por ejemplo cualquier virus hallado en animales. En una forma de realización, el virus incluye virus de los que se sabe infectan los mamíferos, lo que incluye perros, gatos, caballos, ovejas, vacas, etc. En una forma de realización preferida, del virus se sabe que infecta los primates. En una forma de realización más preferida aún, del virus se sabe que infecta seres humanos. Los ejemplos de virus humano incluyen sin limitación, el VIH (virus de inmunodeficiencia humana), el virus del herpes simple, el virus citomegalovirus, virus del varicella zoster, otros virus de herpes humano, el virus de gripe A, el virus sincicial respiratorio, los virus de hepatitis A, B y C, rinovirus, y virus de papiloma humano. En una forma de realización de la invención, el virus es el VIH. Es preferible que el virus sea el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). El VIH también puede ser por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 2 (VIH-2). Lo que precede son representativos de determinados virus para los que en la actualidad se dispone de una quimioterapia antiviral y representan las siguientes familias virales: retroviridae, herpesviridae, orthomyxoviridae, paramyxovirus, picomavirus, flavivirus, pneumovirus y hepadnaviridae. Esta invención puede utilizarse con otras infecciones virales debido a otros virus dentro de estas familias para las que en la actualidad no se dispone de terapia.

Una RAM de acuerdo con la presente invención puede hallarse en una muestra viral obtenida mediante cualquiera medio conocido en la técnica para obtener muestras virales. Tales métodos incluyen sin limitación, obtener una muestra viral de un ser humano o de un animal infectado con el virus u obtener una muestra viral de un cultivo viral. En una forma de realización, la muestra viral se obtiene de un individuo humano infectado por el virus. La muestra viral podría obtenerse de cualquier parte del cuerpo del individuo infectado o de cualquier secreción del que cabe prever que contiene el virus. Los ejemplos de tales partes incluyen sin limitación sangre, suero, plasma, esputos, fluido linfático, semen, mucus vaginal y muestras de otros fluidos corporales. En una forma de realización, la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma.

En una forma de realización, una RAM de acuerdo con la presente invención se halla presente en un virus que puede obtenerse de un cultivo. En algunas formas de realización, el cultivo puede obtenerse de un laboratorio. En algunas formas de realización, el cultivo puede obtenerse de una colección, por ejemplo la American Type Culture Collection.

En determinadas formas de realización, una RAM de acuerdo con la presente invención se halla presente en un

derivado de virus. En una forma de realización, el derivado de virus de por si no es patógeno. En una forma de realización, el derivado del virus es un sistema basado en plasma, en donde la replicación del plásmido o de una célula transfectada con el plásmido es afectada por la presencia o ausencia de la presión selectiva, de manera tal que se selecciona mutaciones que incrementan la resistencia a la presión selectiva. En algunas formas de realización, el derivado del virus comprende los ácidos nucleicos o proteínas de interés, por ejemplo, aquellos ácidos nucleicos a ser apuntados mediante un tratamiento antiviral. En una forma de realización, los genes de interés pueden ser incorporados en un vector. Ver, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. Nros. 5.837.464 y 6.242.187 y la publicación PCT, WO 99/67427. En una forma de realización preferida, los genes pueden ser aquellos que codifican una proteasa o transcriptasa inversa.

En otra forma de realización, no es necesario utilizar el virus intacto. En cambio, es posible utilizar una parte del virus incorporado en un vector. Es preferible que se utilice aquella parte del virus que es apuntada por un fármaco antiviral.

En otra forma de realización, una RAM de acuerdo con la presente invención se halla presente en un virus genéticamente modificado. El virus puede ser modificado genéticamente mediante cualquier método conocido en la especialidad para modificar genéticamente un virus. Por ejemplo, el virus puede ser cultivado durante una cantidad deseada de generaciones en un cultivo de laboratorio. En una forma de realización, no se aplica una presión selectiva (es decir, el virus no es sometido a un tratamiento que favorezca la replicación de virus con determinadas características), y nuevas mutaciones se acumulan por desplazamiento genético aleatorio. En otra forma de realización, se aplica una presión selectiva al virus a medida que se desarrolla en el cultivo (es decir, el virus es cultivado en condiciones que favorecen la replicación de virus que tienen una o más características). En una forma de realización, la presión selectiva es un tratamiento antiviral. Cualquier método de tratamiento conocido puede ser utilizado a título de presión selectiva. En una forma de realización, el virus es VIH y la presión selectiva es un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, el virus es VIH-1 y la presión selectiva es un inhibidor de proteasa. Cualquier inhibidor de proteasa puede utilizarse para aplicar la presión selectiva. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen sin limitación, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa se selecciona de un grupo que consiste en saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En otra forma de realización, el inhibidor de proteasa es lopinavir. Mediante el tratamiento del VIH cultivado in Vitro con un inhibidor de proteasa, por ejemplo, lopinavir, es posible seleccionar cepas mutantes de VIH que tiene una resistencia acrecentada frente al amprenavir. La estrictez de la presión selectiva puede ser manipulada para incrementar o disminuir la supervivencia de virus que no tienen la característica seleccionada.

En otro aspecto, una RAM de acuerdo con la presente invención se prepara mediante la mutagénesis de un virus, un genoma viral, o una parte de un genoma viral. Para esta finalidad puede utilizarse cualquier método de mutagénesis conocido en la especialidad. En una forma de realización, la mutagénesis es esencialmente aleatoria. En otra forma de realización, la mutagénesis esencialmente aleatoria se lleva a cabo exponiendo el virus, genoma viral o parte del genoma viral a un tratamiento mutagénico. En otra forma de realización, un gen que codifica una proteína viral que es el objetivo apuntado de una terapia antiviral es sometido a mutagénesis. Los ejemplos de tratamientos mutagénicos esencialmente aleatorios incluyen, por ejemplo, la exposición a sustancias mutagénicas, (por ejemplo, bromuro de etidio, etilmetanosulfonato, etilnitrosourea (ENU), etc.) la radiación (por ejemplo, luz ultravioleta), la inserción y/o remoción de elementos transponibles (por ejemplo, Tn5, Tn10), o la replicación en una célula, extracto de células, sobre la replicación in vitro que tiene una coeficiente incrementada de mutagénesis. Ver, por ejemplo, Russell et al., 1979, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76:5918-5922; Russell, W., 1982, Environmental Mutagens and Carcinogens: Proceedings of the Third International Conference on Environmental Mutagens. Una persona con pericia en la especialidad comprenderá que si bien cada uno de estos métodos es esencialmente aleatorio, a un nivel molecular, cada uno de ellos tiene sus propios objetivos apuntados preferidos.

En otro aspecto, una mutación que podría afectar la susceptibilidad de un virus a una terapia antiviral, se prepara mediante mutagénesis de sitio dirigido. Puede utilizarse cualquier método de mutagénesis de sitio dirigido conocido en la especialidad (Ver por ejemplo, Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY). La mutagénesis de sitio dirigida puede estar dirigida a, por ejemplo, un gen particular, o región genómica, una parte particular de un gen o región genómica, uno o unos pocos nucleótidos particulares dentro de un gen o región genómica. En una forma de realización, la mutagénesis dirigida a sitio está dirigida a la región genómica de un virus, gen, fragmento de gen, o nucleótido basado en uno o más criterios. En una forma de realización, un gen o a porción de un gen es sometido a mutagénesis dirigida a sitio por cuanto codifica una proteína de la que se sabe o sospecha que es un objetivo apuntado de una terapia antiviral, por ejemplo, el gen que codifica la proteasa del VIH. En otra forma de realización, a porción de un gen, o unos pocos nucleótidos dentro de un gen, son seleccionados para mutagénesis dirigida a sitio. En una forma de realización, los nucleótidos a ser mutagenizados codifican residuos aminoácidos de los que se sabe o sospecha que interactúan con un compuesto antiviral. En otra forma de realización, los nucleótidos a ser mutagenizados codifican residuos aminoácidos de los que se sabe o sospecha que son mutados en cepas virales que una menor susceptibilidad al tratamiento antiviral. En otra forma de realización, los nucleótidos mutagenizados codifican residuos aminoácidos que son adyacentes a, o cercanos a, la secuencia primaria de los residuos de proteína de los que se sabe o sospecha que interactúan con un compuesto antiviral o de los que se sabe o sospecha que son mutados en cepas virales que tienen una menor

susceptibilidad a un tratamiento antiviral. En otra forma de realización, los nucleótidos mutagenizados codifican residuos aminoácidos que son adyacentes o cercanos en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de los residuos de proteína de los que se sabe o sospecha que interactúan con un compuesto antiviral o de los que se sabe o sospechan que tienen una menor susceptibilidad a un tratamiento antiviral. En otra forma de realización, los nucleótidos mutagenizados codifican residuos aminoácidos en o cerca del sitio activo de una proteína de la que se sabe o sospecha que se liga a un compuesto antiviral. Ver, por ejemplo, Sarkar y Sommer, 1990, *Biotechniques*, 8:404-407.

5.4.2 Detección de la presencia o ausencia de mutaciones en un virus

La presencia o ausencia de una RAM de acuerdo con la presente invención en un virus se puede detectar por cualquier medio conocido en la técnica para detectar una mutación. La mutación se puede detectar en el gen viral que codifica una proteína particular, o en la proteína misma, es decir, en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

En una forma de realización, la mutación está en el genoma viral. Tal mutación puede estar en, por ejemplo, un gen que codifica una proteína viral, en una secuencia regulatoria de acción cis o trans de un gen que codifica una proteína viral, una secuencia intergénica o una secuencia de intrón. La mutación puede afectar cualquier aspecto de la estructura, función, replicación o ambiente del virus que cambia su susceptibilidad a un tratamiento antiviral. En una forma de realización, la mutación está en un gen que codifica una proteína viral que es el blanco de un tratamiento antiviral.

Una mutación dentro de un gen viral se puede detectar por la utilización de numerosas técnicas. El ADN o ARN viral se puede usar como el punto de partida para tales técnicas, y se puede aislar de acuerdo con procedimientos estándares que son bien conocidos para los expertos en la técnica.

El ADN o ARN viral se puede usar en los ensayos de hibridación o amplificación para detectar anomalías que involucran la estructura del gen, que incluyen mutaciones puntuales, inserciones, supresiones y reordenamientos genómicos. Tales ensayo puede incluir, pero sin limitación, análisis Southern (Southern, 1975, *J. Mol. Biol.* 98:503-517), análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) (Orita et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770), y análisis de PCR (patentes U. S. Nros. 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; y 4.965.188; *PCR Strategies*, 1995 Innis et al. (eds.), Academic Press, Inc.).

Tales métodos diagnósticos para la detección de una mutación específica del gen puede involucrar por ejemplo, poner en contacto e incubar los ácidos nucleicos virales con uno o más reactivos de ácidos nucleicos marcados que incluyen moléculas de ADN recombinante, genes clonados o sus variantes degeneradas en condiciones favorables para el apareamiento específico de estos reactivos a sus secuencias complementarias. Con preferencia, las extensiones de estos reactivos de ácidos nucleicos son al menos 15 a 30 nucleótidos. Después de la incubación, todos los ácidos nucleicos no apareados se eliminan del híbrido de la molécula de ácido nucleico. La presencia de ácidos nucleicos que han hibridado, si existe tal molécula, detecta posteriormente. Usando tal esquema de detección, el ácido nucleico del virus se puede inmovilizar por ejemplo, en un soporte sólido tal como una membrana, o una superficie plástica tal como una placa de microtitulación o perlas de poliestireno. En este caso, después de la incubación, los reactivos de ácido nucleico marcados apareados del tipo descrito anteriormente se elimina fácilmente. La detección de los reactivos de ácido nucleico marcados apareados restantes se logra usando técnicas estándares bien conocidas por los expertos en la materia. Las secuencias génicas a las que los reactivos de ácido nucleico se han apareado se pueden comparar con el patrón de apareamiento esperado de una secuencia génica normal a fin de determinar si está presente una mutación en el gen.

Los métodos de diagnóstico alternativo para la detección de las moléculas de ácido nucleico específicas del gen pueden involucrar su amplificación, por ejemplo, por PCR (patentes U. S. Nros. 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; y 4.965.188; *PCR Strategies*, 1995 Innis et al. (eds.), Academic Press, Inc.), seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica. Las secuencias amplificadas resultantes se pueden comparar con los que se pueden esperar si el ácido nucleico que se amplifica contenía solo copias normales del gen respectivo a fin de determinar si existe una mutación del gen.

En forma adicional, el ácido nucleico puede secuenciar por cualquier método de secuenciación conocido en la técnica. Por ejemplo, el ADN viral se puede secuenciar por el método de dideoxi de Sanger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463, que también se describe en Messing et al., 1981, *Nuc. Acids Res.* 9:309, o por el método de Maxam et al., 1980, *Methods in Enzymology* 65:499. Ver también las técnicas descritas en Maniatis et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, NY.

Los anticuerpos dirigidos contra los productos del gen viral, es decir, las proteínas virales o fragmentos de péptido viral también se pueden usar para detectar mutaciones en las proteínas virales. De modo alternativo, la proteína viral o fragmentos peptídicos de interés se pueden secuenciar por cualquier método de secuenciación conocido en la técnica a fin de producir la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés. Un ejemplo de tal método es el método de degradación de Edman que se puede usar para secuencias proteínas o polipéptidos pequeños. Las proteínas más grandes se pueden escindir inicialmente con reactivos químicos o enzimáticos conocidos en la

técnica, por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina, tripsina o quimotripsina, y luego se secuencian con el método de degradación de Edman.

5.5 Medición de la susceptibilidad fenotípica de un virus mutante

5 Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para determinar la susceptibilidad fenotípica de un virus mutante o una población de virus para una terapia antiviral. Ver, por ejemplo, patentes U. S. Nros. 5.837.464 y 6.242.187. En algunas formas de realización, se realiza un análisis fenotípico, es decir, se puede analizar la susceptibilidad del virus a un agente antiviral determinado con respecto a la susceptibilidad de un virus de referencia sin las mutaciones. Esta es una medición cuantitativa directa de la susceptibilidad del fármaco y se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica para determinar la susceptibilidad de un virus a un agente antiviral. Un ejemplo de tales métodos incluye, pero sin limitación, determinar el nivel de cambio de los valores de IC₅₀ con respecto a un virus de referencia. El análisis fenotípico mide la capacidad de una cepa viral específica de crecer in vitro en presencia de un inhibidor del fármaco. Un virus es menos susceptible a un fármaco particular cuando se requiere más fármaco para inhibir la actividad viral, versus la cantidad de fármaco requerida para inhibir el virus de referencia.

15 En una forma de realización, el análisis fenotípico se realiza y usa para calcular la IC₅₀ o IC₉₀ de un fármaco para una cepa viral. Los resultados del análisis también se pueden presentar como veces de cambio de IC₅₀ o IC₉₀ para cada cepa viral en comparación con una cepa control susceptible al fármaco o una cepa viral previa del mismo paciente. Debido a que el virus se expone directamente a cada una de las medicaciones antiviral descritas, los resultados se puede vincular directamente con la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, si el virus del paciente muestra resistencia a un fármaco particular, este fármaco se evita u omite del régimen de tratamiento del paciente, lo que permite al médico diseñar un plan de tratamiento que sea probablemente más efectivo durante un período de tiempo más largo.

20 En otra forma de realización, el análisis fenotípico se realiza usando ensayos de virus recombinante ("RVA"). Los RVA usan patrones de virus generados por recombinación homóloga entre vectores virales y secuencias del gen viral, amplificadas del virus del paciente. En algunas formas de realización, el vector viral es un vector de VIH y las secuencias del gen viral pueden ser secuencias de proteasa y transcriptasa inversa.

25 En una forma de realización, el análisis fenotípico se realiza usando PHENOSENSE™ (ViroLogic Inc., South San Francisco, CA). Ver Petropoulos et al., 2000, Antimicrob. Agents Chemother. 44:920-928; patentes U. S. Nros. 5.837.464 y 6.242.187. PHENOSENSE™ es un ensayo fenotípico que obtiene los beneficios del análisis fenotípico y supera los inconvenientes de los ensayos previos. Debido a que el ensayo se ha automatizado, PHENOSENSE™ ofrece mayor rendimiento en condiciones controladas. El resultados es un ensayo que define con precisión el perfil de susceptibilidad de cepas de VIH del paciente para todos los fármacos antirretroviral disponibles en la actualidad y entrega resultados directamente al médico dentro de 10 a aproximadamente 15 días de recepción de la muestra. PHENOSENSE™ es preciso y puede obtener resultados con solo una ronda de replicación viral, de este modo evita la selección de subpoblaciones de virus. Los resultados son cuantitativos, miden diversos grados de susceptibilidad al fármaco, y sensible – la prueba se puede realizar en muestras de sangre con una carga viral de aproximadamente 30 500 copias/mL y puede detectar poblaciones de la minoría de algunos virus resistentes al fármaco en concentraciones de 10% o menos de la población viral total. Además, los resultados son reproducibles y pueden variar en menos de aproximadamente 1,4-2,5 veces, de acuerdo con el fármaco, en aproximadamente 95% de los ensayos realizados.

35 PHENOSENSE™ se puede usar con ácidos nucleicos provenientes de las secuencias del gen viral amplificadas. Como se describe en la Sección 5.4.1, la muestra que contiene el virus puede ser una muestra de un ser humano o infectado con el virus o una muestra de un cultivo de células virales. En una forma de realización, la muestra viral comprende una cepa de laboratorio genéticamente modificada.

45 Un vector de ensayo de resistencia ("RTV") luego se puede construir por la incorporación de las secuencias del gen viral amplificadas en un vector viral de replicación defectuosa por el uso de cualquier método conocido en la técnica de incorporación de secuencias génicas en un vector. En una forma de realización, se usan enzimas de restricción y métodos de clonación convencionales. Ver Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NV y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, NY. En algunas formas de realización, se usan enzimas de restricción Apal y PinAI. Con preferencia, el vector viral de replicación defectuosa es el vector viral del gen indicador ("IGW"). En algunas formas de realización, el vector viral contiene un medio para detectar la replicación del RTV. Con preferencia, el vector viral contiene un casete de expresión de luciferasa.

55 El ensayo se puede realizar primero por co-transfección de las células huésped con ADN de RTV y un plásmido que expresa las proteínas de la envoltura de otro retrovirus, por ejemplo, virus de leucemia murina anfitriónica (MLV). Después de la transfección, se pueden recolectar las partículas del virus y usar para infectar células blanco frescas. La terminación de una ronda única de replicación viral se puede detectar por medio para detectar la replicación contenida en el vector. En una forma de realización, la terminación de una ronda única de la replicación viral genera la producción de luciferasa. Se pueden añadir concentraciones seriadas de los agentes antivirales en la etapa de

transfección o la etapa de infección.

La susceptibilidad para el agente antiviral se puede medir por la comparación de la replicación del vector en presencia y ausencia del agente antiviral. Por ejemplo, la susceptibilidad al agente antiviral se puede medir por la comparación de la actividad de luciferasa en presencia y ausencia del agente antiviral. Los virus susceptibles pueden producir niveles bajos de actividad de luciferasa en presencia de agentes antivirales, mientras que los virus con reducción de susceptibilidad pueden producir niveles más altos de la actividad de luciferasa.

En una forma de realización, se usa PHENOSENSE™ para evaluar la susceptibilidad fenotípica del VIH-1 para los fármacos antivirales. Con preferencia, el fármaco antiviral es un inhibidor de proteasa. Con más preferencia, es lopinavir. En algunas formas de realización, la cepa viral de referencia es la cepa NL4-3 o HXB-2 de VIH.

En una forma de realización, el ácido nucleico viral, por ejemplo, el ARN de VIH-1 se puede extraer de las muestras de plasma, y un fragmento de, o genes virales enteros se pueden amplificar por métodos tales como, pero sin limitación a PCR. Ver, por ejemplo, Hertogs et al., 1998, *Antimicrob Agents Chemother* 42(2):269-76. En un ejemplo, un fragmento de 2,2 kb que contiene la secuencia codificadora de PR y RT del VIH-1 se puede amplificar por PCR de transcripción inversa anidada. La mezcla del ácido nucleico amplificado, por ejemplo, las secuencias modificadoras de PR-RT, luego se puede cotransfectar en una célula huésped tal como linfocitos T CD4+ (MT4) con el plásmido pGEMT3deltaPRT del cual se suprimen la mayor parte de las secuencias de PR (codones 10 a 99) y RT (codones 1 a 482). La recombinación homóloga lleva a la generación de virus quiméricos que contienen secuencias codificadoras virales, tal como las secuencias codificadoras de PR y RT derivados del ARN de VIH-1 en el plasma. Las susceptibilidades de los virus quiméricos para los agentes antivirales disponibles en la actualidad que se dirigen a los productos de los genes transfectados (por ejemplo, inhibidores de proRT y/o PR), se pueden determinar por cualquier ensayo de viabilidad celular conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de viabilidad celular basado en bromuro de célula MT4-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio en un sistema automatizado que permite alto rendimiento de muestra. El perfil de resistencia a todos los agentes antivirales, tal como los inhibidores de RT y PR, se pueden presentar gráficamente en un PR-RT-Antivirograma.

Se puede usar otros ensayos para evaluar la susceptibilidad fenotípica de un virus a fármacos antivirales conocidos por los expertos en la técnica, Ver, por ejemplo, Shi y Mellors, 1997, *Antimicrob Agents Chemother*. 41(12):2781-85; Gervais et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94(9):4653.

En otra forma de realización, la susceptibilidad de un virus para el tratamiento con un tratamiento antiviral se determina por el ensayo de la actividad del blanco del tratamiento antiviral en presencia del tratamiento antiviral. En una forma de realización, el virus es VIH, el tratamiento antiviral es un inhibidor de proteasa y el blanco del tratamiento antiviral es la proteasa de VIH. Ver, por ejemplo, patentes U.S. Nros. 5.436.131, 6.103.462.

5.6 Correlación de la susceptibilidad fenotípica y genotípica

Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para determinar si una mutación se correlaciona con una disminución de la susceptibilidad de un virus para un tratamiento antiviral y, en consecuencia, es una RAM de acuerdo con la presente invención. En una forma de realización, los valores de P se usan para determinar la significancia estadística de la correlación, de modo que a menor valor de P, más significativa es la medición. Con preferencia, los valores P serán menores de 0,05. Con más preferencia, los valores de P serán menores que 0,01. Los valores de P se pueden calcular por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. En una forma de realización, los valores de P se calculan usando la prueba exacta de Fisher. Ver, por ejemplo, David Freedman, Robert Pisani & Roger Purves, 1980, *STATISTICS*, w. W. Norton, New York.

En una forma de realización, las cantidades de muestras con la mutación que se está analizando que tienen un número de veces de cambio de IC₅₀ por debajo o encima de 10 veces se comparan con las cantidades de muestras sin la mutación. Se puede construir una tabla 2x2 y el valor P se puede calcular usando la Prueba exacta de Fisher (ver, Ejemplo 5). Los valores de P menores que 0,05 ó 0,01 se pueden clasificar como estadísticamente significativo.

5.7 Determinación de la susceptibilidad al tratamiento antiviral

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una susceptibilidad del virus al tratamiento antiviral. Las mutaciones asociadas a la resistencia (RAM) se pueden identificar y correlacionar con la reducción de la susceptibilidad de un virus a un tratamiento antiviral como se describe en las Secciones 5.3-5.6 anteriores. La presencia de una RAM en un virus se puede detectar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Sección 5.4.2 anterior. La presencia de una RAM en el virus puede indicar que el virus tiene un aumento de probabilidad de tener reducción de la susceptibilidad para el tratamiento antiviral. En una forma de realización, el virus es el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En otra forma de realización, el virus es el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). En otra forma de realización, el tratamiento antiviral es un inhibidor de proteasa. Los Ejemplos de los inhibidores de proteasa incluyen, pero sin limitación, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa se selecciona de un grupo que consiste en saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En otra forma de realización, el inhibidor de proteasa es lopinavir.

En otra forma de realización, se describe en la presente un método para determinar si un VIH tiene una probabilidad aumentada de tener una reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende detectar en la proteasa de dicho VIH o en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa, la presencia o ausencia de una mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 20, 33, 34, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 58, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, donde la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene un aumento de probabilidad de tener reducción de susceptibilidad al tratamiento con el inhibidor de proteasa en comparación con un VIH sin dicha mutación, por ejemplo, un VIH de tipo salvaje o referencia, con la condición de que dicha mutación no es K20M, K20R, M46I, M46L, I54L, I54T, I54V, L63P, V82A, V82F, V82T o I84V. En una forma de realización, la mutación se detecta en la proteasa de dicho VIH. En otra forma de realización, la mutación se detecta en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa.

En otra forma de realización, la mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa está en la posición de aminoácido 20, 33, 34, 46, 50, 54, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea K20M, K20R, L33F, L33M, K43T, M46I, M46L, I50V, I54A, I54L, I54M, I54S, I54T, I54V, L63P, G73A, G73S, G73T, T74S, V82A, V82F, V82I V82S, V82T o I84V.

En otra forma de realización, la mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa está en la posición de aminoácido 10, 32, 47, 53, 71 ó 95 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea V32I o I47V. En una forma de realización, la mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, F53L y A71L.

En otra forma de realización, la mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, I54A, I54M, I54S, L63T, V82S, I84A, I84L, L33F, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50L, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, I33I, I33V, E34D, E34K, E34Q, I50V, I54M, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, G73C, T74A, T74P, L76V, p79Á, P79D, P79E, L89I y L89M.

En otro aspecto, se describe en la presente un método para determinar si un VIH tiene un aumento de probabilidad de tener una reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un primer inhibidor de proteasa, que comprende detectar en la proteasa de dicho VIH la presencia o ausencia de una mutación asociada con la reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un segundo inhibidor de proteasa, donde la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene un aumento de probabilidad de presentar reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho primer inhibidor de proteasa. en una forma de realización, el primer inhibidor de proteasa es lopinavir. En otra forma de realización, el segundo inhibidor de proteasa es amprenavir. En otra forma de realización, las mutaciones en la proteasa están en la posición de aminoácido 11, 32, 33, 34, 43, 46, 47, 48, 50, 54, 58, 71, 76, 79, 82, 84 ó 95 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea V32I, M46I, M46L, I47V, I50V, I54L, I54M, V82A o I84V.

En otra forma de realización, se describe en la presente un método de determinar si un individuo afectado con VIH tiene un aumento de probabilidad de presentar una reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un primer inhibidor de proteasa, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un segundo inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 11, 32, 33, 34, 43, 46, 47, 48, 50, 54, 58, 71, 76, 79, 82, 84 ó 95 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, donde la presencia de dicha mutación indica que el individuo tiene un aumento de probabilidad de presentar reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho primer inhibidor de proteasa, con la condición de que dicha mutación nos ea V32I, M46I, M46L, I47V, I50V, IML, I54M, V82A o I84V.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la susceptibilidad de un individuo infectado con un virus al tratamiento antiviral. Las mutaciones asociadas con resistencia (RAM) se pueden identificar y correlacionar con reducción de la susceptibilidad de un virus a un tratamiento antiviral como se describió en las Secciones 5.3-5.6 anteriores. La presencia de una RAM en un virus presente en una muestra del individuo se puede detectar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Sección 5.4.2 anterior. La presencia de una RAM en el virus puede indicar que el individuo tiene un aumento de probabilidad de presentar reducción de la susceptibilidad para el tratamiento antiviral. En una forma de realización, el virus es VIH. En otra forma de realización, el virus es VIH-1. En otra forma de realización, el tratamiento antiviral es un inhibidor de proteasa. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen, pero sin limitación, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En una forma de realización, el inhibidor de proteasa se selecciona de un grupo que consiste en saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En otra forma de realización, el inhibidor de proteasa es lopinavir.

En otra forma de realización, se describe en la presente un método para determinar si un individuo infectado con VIH

tiene un aumento de probabilidad de presentar una reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 20, 33, 34, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 58, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, donde la presencia de dicha mutación indica que el individuo tiene un aumento de probabilidad de presentar reducción de la susceptibilidad al tratamiento con el inhibidor de proteasa en comparación con un individuo infectado con un VIH sin dicha mutación, por ejemplo, un VIH tipo salvaje o de referencia, con la condición de que dicha mutación no sea K20M, K20R, M46I, M46L, I54L, I54T, I54V, L63P, V82A, V82F, V82T o I84V. En una forma de realización, la mutación se detecta en la proteasa de dicho VIH. En otra forma de realización, la mutación se detecta en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa.

En otra forma de realización, se describe en la presente un método para determinar la efectividad del tratamiento del inhibidor de proteasa de un individuo infectado con un VIH, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 20, 33, 34, 46, 50, 54, 63, 66, 73, 74, 76, 79, 82, 84 u 89 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, donde la presencia de dicha mutación indica que el individuo tiene una reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa, con la condición de que dicha mutación no sea K20M, K20R, L33F, L33M, K43T, M46I, M40L, I50V, I54A, I54L, I54M, I54S, I54T, I54V, L63P, G73A, G73S, G73T, T74S, V82A, V82F, V82I, V82S, V82T o I84V.

En otra forma de realización, la mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa está en la posición de aminoácido 10, 11, 32, 47, 53, 71 ó 95 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, con la condición de que dicha mutación no sea V32I o I47V. En una forma de realización, la mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, F53L y A71L.

En otra forma de realización, la mutación asociada con reducción de la susceptibilidad al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, I54A, I54M, I54S, L63T, V828, I84A, I84L, L33F, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, K43T, G48V, I50L, I50V, K55R, Q58E, G73C, G73T, T74A, T74P, T74S, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, I50V, I54M, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M. En otra forma de realización, la mutación se selecciona del grupo que consiste en: K20I, M46V, I50L, L63T, I84A, I84L, L33I, L33V, E34D, E34K, E34Q, G73C, T74A, T74P, L76V, P79A, P79D, P79E, L89I y L89M.

5.8 Construcción de un algoritmo

En un aspecto, se proporciona en la presente un método de construir un algoritmo que se correlaciona con los datos genotípicos acerca de un virus con los datos fenotípicos acerca del virus. En una forma de realización, los datos fenotípicos se refieren a la susceptibilidad del virus a un tratamiento antiviral. En otra forma de realización, el tratamiento antiviral es un compuesto antiviral. En otra forma de realización, el compuesto antiviral es un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, el inhibidor de proteasa es lopinavir.

En una forma de realización, el método de construir el algoritmo comprende crear una regla no reglas que correlacionan los datos genotípicos acerca de un conjunto de virus con los datos fenotípicos acerca del conjunto de virus.

En una forma de realización, se ensambla un conjunto de datos de la muestra de prueba que comprende datos genotípicos y fenotípicos acerca de cada virus en un conjunto de virus. Cualquier método conocido en la técnica se puede usar para recolectar datos genotípicos acerca de un virus. Los ejemplos de métodos de recolectar tales datos se proporcionaron antes. Cualquier método conocido en la técnica se puede usar para recolectar datos fenotípicos acerca de un virus. Los ejemplos de tales métodos se proporcionaron antes. En algunas formas de realización, el conjunto de dato de la muestra de prueba comprende una o más RAM descritas anteriormente. En una forma de realización, cada dato genotípico es la secuencia del total o parte de una proteína viral de un virus en el conjunto de virus. En otra forma de realización, cada dato genotípico del conjunto de datos de entrenamiento es un cambio de aminoácidos único en una proteína codificada por el virus, con respecto a una proteína de referencia en el virus de referencia. En otras formas de realización, el genotipo comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o más cambios de aminoácidos en la proteína viral. En otra forma de realización, el virus es VIH, y la proteína es VIH proteasa. En una forma de realización, el virus es VIH-1. En otra forma de realización, la proteína de referencia es la proteasa de VIH NLA-3.

En una forma de realización, cada dato fenotípico del conjunto de datos de entrenamiento es la susceptibilidad a un tratamiento antiviral de un virus en el conjunto de virus. En una forma de realización, el tratamiento antiviral es un compuesto antiviral. En otra forma de realización, el compuesto antiviral es un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, el inhibidor de proteasa es lopinavir. En una forma de realización, la susceptibilidad se mide como un cambio en la susceptibilidad del virus con respecto a un virus de referencia. En otra forma de realización, la susceptibilidad se mide como un cambio en la IC₅₀ del virus con respecto a un virus de referencia. En otra forma de

realización, el cambio de la IC_{50} se representa como veces de cambio de IC_{50} . En una forma de realización el virus es VIH. En otra forma de realización, el virus es VIH-i. En otra forma de realización, el VIH de referencia es NLA4-3 del VIH.

5 Los datos genotípicos y fenotípicos del conjunto de datos de entrenamiento se puede representar u organizar de cualquier manera conocida en la técnica. En una forma de realización, los datos se presentan en la forma de gráfico, por ejemplo, como se muestra en las Figuras 2 y 7. En este tipo de representación, el eje y representa el número de veces de cambio de la IC_{50} de un virus en el conjunto de datos respecto de un virus de referencia. Cada punto en el gráfico corresponde a un virus en el conjunto de datos. El eje x representa la cantidad de mutaciones que tiene un conjunto de datos. La posición del punto indica tanto la cantidad de mutaciones como las veces de cambio en el tratamiento de la terapia antiviral que tiene el virus, ambos medidos con respecto a una cepa de referencia. En otra forma de realización, los datos genotípicos y fenotípicos del conjunto de datos de entrenamiento ase presentan en la forma de un cuadro, por ejemplo, como se muestra en la Figura 2.

15 En un aspecto, se formula un algoritmo que correlaciona los datos genotípicos con los datos fenotípicos en el conjunto de datos de entrenamiento. En una forma de realización, se define un punto límite fenotípico. En otra forma de realización, el fenotipo es susceptibilidad a un tratamiento antiviral. En otra forma de realización, el fenotipo es el cambio de susceptibilidad a un tratamiento antiviral con respecto a un virus de referencia, y el punto límite es el valor por encima del cual se define un virus o población de virus como fenotípicamente resistente ("PT-R") a la terapia antiviral y por debajo del cual un virus o población de virus se define como fenotípicamente sensible ("PT-S") a la terapia antiviral. En otras formas de realización, el punto límite es 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o 100 veces mayor que la IC_{50} de un virus de referencia. En otra forma de realización, el punto límite fenotípico es el valor límite clínico definido anteriormente. En otra forma de realización, el virus es VIH y la terapia antiviral es el tratamiento con un inhibidor de proteasa. En otra forma de realización, el inhibidor de proteasa es lopinavir.

25 En otra forma de realización, el punto límite fenotípico se usa para definir un punto límite genotípico. En una forma de realización esto se realiza por la correlación del número de mutaciones en un virus del conjunto de datos de entrenamiento con la susceptibilidad fenotípica del virus. Esto se puede realizar, por ejemplo, usando un gráfico similar al de la Figura 2, como se describió anteriormente. Un punto límite genotípico se selecciona de modo que la mayor parte de los virus que tengan más que el número de mutaciones del conjunto de datos sean fenotípicamente resistentes ("PT-R"), y la mayor parte de los virus tienen menos del número de mutaciones son fenotípicamente sensibles ("PT-S"). Por definición, un virus del conjunto de datos de entrenamiento con el número de mutaciones igual a, o más del límite genotípico es genotípicamente resistentes ("GT-R") al tratamiento antiviral, y un virus en el conjunto de datos de entrenamiento con menos que el número límite genotípico de mutaciones es genotípicamente sensible ("GT-S") al tratamiento antiviral. En consecuencia, en una forma de realización, se selecciona un punto límite genotípico que produce el mayor porcentaje de virus del conjunto de datos de entrenamiento que son fenotípicamente resistentes y genotípicamente resistentes ("PT-R, GT-R"), o fenotípicamente sensibles y genotípicamente sensibles ("PT-S, GT-S").

35 Si bien este simple algoritmo puede proporcionar una aproximación útil de la relación entre los datos genotípicos y fenotípicos del conjunto de datos de entrenamiento, en la mayoría de los casos existirá un número significativo de cepas que son genotípicamente sensibles pero fenotípicamente resistentes ("GT-S, PT-R"), o genotípicamente resistentes pero fenotípicamente sensibles ("GT-R, PT-S"), como se muestra en las Figuras 2 y 7. Estos resultados discordantes con una medida de la inexactitud del algoritmo. En consecuencia, en algunas formas de realización, el algoritmo también se modifica para reducir el porcentaje de resultados discordantes del conjunto de datos de entrenamiento. En una forma de realización, esto se realiza por la eliminación del conjunto de dato de cada punto de los datos que corresponde a una población viral que comprende una mezcla de mutaciones que incluyen el tipo salvaje, en una posición única considerada por el algoritmo analizado. Como se muestra en la Figura 3 y el Ejemplo 3, esto tiene el efecto de reducir el número de resultado PT-S, GT-R, en consecuencia se reduce el porcentaje total de resultados discordantes y de esta manera mejora el ajuste del algoritmo a un conjunto de datos de entrenamiento.

40 En otra forma de realización, el porcentaje de resultados discordantes se reduce por la asignación de valores de ponderación diferenciales a una o más de las mutaciones observadas en el conjunto de datos de entrenamiento. Un algoritmo que no incluye esta etapa asume que cada mutación del conjunto de datos de entrenamiento contribuye de igual manera a la resistencia global de un virus o población de virus a una terapia antiviral. En muchos casos esto no será válido. La Figura 4 muestra un ejemplo de una mutación de un conjunto de datos de entrenamiento que casi siempre se correlaciona con la resistencia fenotípica a un tratamiento antiviral. Es decir, casi todos los virus que tienen la mutación son fenotípicamente resistentes al tratamiento antiviral, incluso las cepas que tienen solo uno o dos mutaciones totales. En una forma de realización, tales mutaciones son "ponderadas" es decir, se les asigna una puntuación de mutación aumentada. A una mutación se puede asignar una ponderación de, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más. Por ejemplo, a una mutación que se asigna una ponderación de 2 se contará como dos mutaciones en un virus. También se pueden asignar valores de ponderación fraccionales. En otra forma de realización, los valores menores de 1, y menores de cero, se pueden asignar, cuando una mutación se asocia con un aumento de susceptibilidad del virus al tratamiento antiviral.

Los expertos en la técnica apreciarán que existe un equilibrio involucrado en la asignación de aumento de ponderación a ciertas mutaciones. A medida que la ponderación de la mutación aumenta, el número de resultados discordantes GT-R, PT-S puede aumentar. En consecuencia, la asignación de una ponderación a una mutación que sea demasiado grande puede aumentar la discordancia total del algoritmo. Por consiguiente, en una forma de realización, se asigna una ponderación a una mutación que equilibra la reducción de los resultados de GT-S, PT-R con el aumento de los resultados de GT-R, PT-S.

En otra forma de realización, la interacción de diferentes mutaciones en el conjunto de datos de entrenamiento entre sí también se toma en cuenta en el algoritmo. Por ejemplo, se podría hallar que dos o más mutaciones se comportan en forma sinérgica, es decir, que la coincidencia de las mutaciones en un virus contribuye más significativamente a la resistencia del virus que la que se puede predecir sobre la base del efecto de cada mutación independiente de la otra. De modo alternativo, se podría hallar que la coincidencia de dos o más mutaciones in a virus contribuye menos significativamente a la resistencia del virus que la que puede esperarse de las contribuciones realizadas a la resistencia por cada mutación cuando esta se produce de modo independiente. Asimismo, se puede hallar que dos o más mutaciones aparecen más frecuentemente juntas que como mutaciones independientes. En consecuencia, en una forma de realización, las mutaciones que se producen juntas se ponderan juntas. Por ejemplo, a solo una de las mutaciones se asigna una ponderación de 1 o más y a la otra mutación o mutaciones se asigna una ponderación de cero, a fin de evitar un aumento del número de resultados discordantes de GT-R, FT-S.

En otro aspecto, el punto límite fenotípico se puede usar para definir un punto límite genotípico por la correlación del número así como la clase de mutaciones en un virus del conjunto de datos con la susceptibilidad fenotípica del virus. Los ejemplos de clases de mutaciones incluyen, pero sin limitación, mutaciones de aminoácidos primarios, mutaciones de aminoácidos secundarios, mutaciones en que se conserva la carga neta del polipéptido y mutaciones que no alteran la polaridad, hidrofobicidad o hidrofiliidad del aminoácido en una posición particular. Otras clases de mutaciones que están dentro del alcance de la invención deberían ser evidentes para los expertos en la técnica, sobre la base de las enseñanzas de la presente.

En una forma de realización, se construye un algoritmo que toma en cuenta el requerimiento para una o más clases de mutaciones. En otra forma de realización, el algoritmo toma en cuenta el requerimiento de un número mínimo de una o más clases de mutaciones. En otra forma de realización, el algoritmo toma en cuenta el requerimiento de un número mínimo de mutaciones primarias o secundarias. En otra forma de realización, el requerimiento para una mutación primaria o secundaria en combinación con otras mutaciones también se toma en cuenta en el algoritmo. Por ejemplo, se podría hallar que un virus con una combinación particular de mutaciones es resistente a un tratamiento antiviral, mientras que un virus con cualquier mutación en esta combinación, solo o con otras mutaciones que no son parte de la combinación, no es resistente al tratamiento antiviral.

Por el uso de, por ejemplo, los métodos descritos anteriormente, el algoritmo se puede diseñar para obtener cualquier resultado deseado. En una forma de realización, el algoritmo se diseña para maximizar la concordancia global (la suma de los porcentajes de los grupos PT-R, GT-R y PT-S, GT-S, o 100 - (porcentaje de los grupos PT-S, GT-R + PT-R, GT-S)). En algunas formas de realización, la concordancia global es mayor de 75%, 80%, 85%, 90% o 95%. En una forma de realización, el algoritmo se diseña para minimizar el porcentaje de resultados PT R, GT-S. En otra forma de realización, el algoritmo se diseña para minimizar el porcentaje de resultados PT-S, GT-R. En otra forma de realización, el algoritmo se diseña para maximizar el porcentaje de resultados PT-S, GT-S. En otra forma de realización, el algoritmo se diseña para maximizar el porcentaje de resultados PT-R, GT-R.

En cualquier punto durante la construcción del algoritmo, o después de construirlo, también se puede analizar un segundo conjunto de datos. En una forma de realización, el segundo conjunto de datos consiste en virus que no incluyen en el conjunto de datos de entrenamiento, es decir, el segundo conjunto de datos es un conjunto de datos sin tratamiento. En otra forma de realización, el segundo conjunto de datos contiene uno o más virus que estaban en el conjunto de datos de entrenamiento y uno o más virus que no estaban en el conjunto de de datos de entrenamiento. El uso del algoritmo en un segundo conjunto de datos, particularmente un conjunto de datos sin tratamiento previo, permite evaluar la capacidad predictiva del algoritmo. En consecuencia, en una forma de realización, la exactitud de un algoritmo se evalúa usando un segundo conjunto de datos, y las reglas del algoritmo se modifican como se describió antes para mejorar la exactitud. En otra forma de realización, se usa un abordaje iterativo para crear el algoritmo, con el cual se prueba un algoritmo y luego se modifica repetidamente hasta obtener un nivel de exactitud deseado.

5.9 Uso de un algoritmo para predecir la susceptibilidad de un virus

En otro aspecto, la descripción también proporciona un método para usar un algoritmo de la invención para predecir la susceptibilidad fenotípica de un virus o un derivado de un virus para un tratamiento antiviral basado en el genotipo del virus. En una forma de realización, el método comprende detectar, en el virus o derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más RAM, aplicando las reglas del algoritmo a las RAM detectadas, donde un virus que satisface las reglas del algoritmo es genotípicamente resistente al tratamiento antiviral, y un virus que no satisface las reglas del algoritmo es genotípicamente sensible al tratamiento antiviral. En otra forma de realización, el método comprende detectar, en el virus o derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más RAM, aplicando las reglas del algoritmo a las RAM detectadas, donde una puntuación igual a, o mayor que la puntuación del límite

genotípico indica que el virus es genotípicamente resistente al tratamiento antiviral, y una puntuación menor que la puntuación del límite genotípico indica que el virus es genotípicamente sensible al tratamiento antiviral.

5 El algoritmo se puede usar para cualquier enfermedad viral donde la susceptibilidad al fármaco antiviral es un problema, como se describió antes en la Sección 5.4.1. En ciertas formas de realización, el ensayo se puede usar para determinar la susceptibilidad de un retrovirus a un fármaco antiviral. En una forma de realización, el retrovirus es VIH. Con preferencia, el virus es VIH-1.

10 El agente antiviral descrito en la presente puede ser cualquier tratamiento efectivo contra un virus. Es útil en la práctica de esta invención, por ejemplo, entender la estructura, ciclo vital y elementos genéticos de los virus que se pueden analizar en la prueba de susceptibilidad al fármaco de esta invención. Esto puede ser conocido por los expertos en la técnica y proporcionan, por ejemplo, enzimas clave y otras moléculas a las que se puede dirigir el agente antiviral. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero sin limitación, inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa tales como AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, abacavir, inhibidores nucleotídicos de transcriptasa inversa tales como tenofovir, inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa inversa tales como nevirapina, efavirenz, delavirdina, inhibidores de la fusión tales como T-20 y T-1249 e inhibidores de proteasa tal como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir.

15 En algunas formas de realización, los agentes antivirales se dirigen a los retrovirus. En ciertas formas de realización, los agentes antivirales son inhibidores de proteasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En una forma de realización, el agente antiviral es lopinavir.

20 Algunas mutaciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un agente antiviral son conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Kempf et al., 2001, J. Virol 75:7462-69. Otros se pueden determinar por métodos descritos en las Secciones 5.3 - 5.8 anteriores. Por ejemplo, la Tabla 1 proporciona una lista de mutaciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir.

5.10 Uso de un algoritmo para predecir la efectividad del tratamiento antiviral para un individuo

25 En otro aspecto, la descripción también proporciona un método para usar un algoritmo de la invención para predecir la efectividad de un tratamiento antiviral para un individuo infectado con un virus basado en el genotipo de del virus para el tratamiento antiviral. En una forma de realización, el método comprende detectar, en el virus o un derivado del virus, la presencia o ausencia de uno o más RAM, aplicar las reglas del algoritmo a las RAM detectadas, donde un virus que satisface las reglas del algoritmo es genotípicamente resistente al tratamiento antiviral, y un virus que no satisface las reglas del algoritmo es genotípicamente sensible al tratamiento antiviral. En otra forma de realización, el método comprende detectar, en el virus o un derivado del virus, la presencia o ausencia de uno o más RAM, aplicar las reglas del algoritmo a las RAM detectadas, donde una puntuación igual a, o mayor de la puntuación del límite genotípico indica que el virus es genotípicamente resistente al tratamiento antiviral, y una puntuación menor que la puntuación del límite genotípico indica que el virus es genotípicamente sensible al tratamiento antiviral.

30 Como se describe en la Sección 5.4.1 anterior, el algoritmo se puede usar para cualquier enfermedad viral donde la susceptibilidad al fármaco antiviral es un problema y el agente antiviral de la invención puede ser cualquier tratamiento efectivo contra un virus. En ciertas formas de realización el ensayo se usa para determinar la susceptibilidad de un retrovirus a un fármaco antiviral. En una forma de realización, el retrovirus es VIH. Con preferencia, el virus es VIH-1. En algunas formas de realización, los agentes antivirales se dirigen a los retrovirus. En ciertas formas de realización, los agentes antivirales son inhibidores de proteasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En una forma de realización, el agente antiviral es lopinavir.

35 Como se describió en la Sección 5.9 anterior, las mutaciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al tratamiento con un agente antiviral se pueden obtener a partir de la técnica o determinar por los métodos descritos anteriormente en las Secciones 5.4 - 5.8.

45 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un método para controlar la efectividad de un tratamiento antiviral en un individuo infectado con un virus y que se somete o se ha sometido antes al tratamiento con el mismo o diferente tratamiento antiviral, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de un residuo de aminoácido asociado con la reducción de la susceptibilidad al tratamiento del tratamiento antiviral, donde la presencia del residuo se correlaciona con una reducción de la susceptibilidad al tratamiento con el tratamiento antiviral.

50 5.11 Correlación de la susceptibilidad a un tratamiento antiviral con la susceptibilidad a otro tratamiento antiviral

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para usar un algoritmo descrito en la presente para predecir la efectividad de un tratamiento antiviral contra un virus basado en la susceptibilidad genotípica del virus a un tratamiento antiviral diferente. En una forma de realización, el método comprende detectar, en un virus o un derivado de un virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones correlacionadas con la resistencia a un tratamiento antiviral y aplicar las reglas de un algoritmo a las mutaciones detectadas, donde un virus que satisface las reglas del algoritmo es genotípicamente resistente al tratamiento antiviral y un virus que no satisface las reglas

del algoritmo es genotípicamente sensible al tratamiento antiviral. En otra forma de realización, el método comprende detectar, en el virus o un derivado del virus, la presencia o ausencia de uno o más mutaciones correlacionadas con la resistencia a un tratamiento antiviral y aplicar las reglas del algoritmo a las mutaciones detectadas, donde una puntuación igual a, o mayor de la puntuación del límite genotípico indica que el virus es genotípicamente resistente a un tratamiento antiviral diferente, y una puntuación menor que la puntuación del límite genotípico indica que el virus es genotípicamente sensible a un tratamiento antiviral diferente. En otra forma de realización, los dos tratamientos antivirales afectan la misma proteína viral. En otra forma de realización, los dos tratamientos antivirales son ambos inhibidores de proteasa. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen, pero sin limitación, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y lopinavir. En aún otra forma de realización, uno de los dos tratamientos antivirales es lopinavir. En aún otra forma de realización, una mutación correlacionada con la resistencia a un inhibidor de proteasa también se correlaciona con otro inhibidor de proteasa. Los ejemplos de tales mutaciones se proporcionan en el siguiente Ejemplo 8.

6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención y no se consideran limitantes del tema de la presente.

6.1 Ejemplo 1: Análisis de muestras del paciente para identificar mutaciones asociadas con resistencia

Este ejemplo demuestra un método de analizar muestras del paciente para identificar mutaciones que se asocian con aumento o con disminución de la susceptibilidad a los inhibidores de proteasa tal como lopinavir.

A fin de determinar la relación entre una secuencia de proteasa de la cepa de VIH-1 y su susceptibilidad al tratamiento con lopinavir, se analizó un conjunto de datos de entrenamiento de 2038 muestras de plasma de paciente en forma genotípica así como fenotípica. El ensayo fenotípico se realizó usando el ensayo de VIH PHENOSENSE™ (Virologic, South San Francisco, CA) (Petropoulos et al., 2000, Antimicrob. Agents Chemother. 44:920-928; patentes U. S. Nros. 5.837.464 y 6.242.187). Las muestras de paciente se recolectaron de los pacientes infectados con VIH-1. Las muestras repetidas del mismo paciente se eliminaron para evitar el posible sesgo resultante de las combinaciones de mutaciones únicas. Los valores de IC₅₀ para lopinavir se obtuvieron para el VIH-1 de la muestra del paciente. Esto se comparó con la IC₅₀ para lopinavir contra la cepa viral de referencia NL4-3 (Acceso a GenBank N.º AF324493). Los datos fenotípicos se expresaron como “veces de cambio” (o log de veces de cambio) en la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) de lopinavir. Los valores de veces de IC₅₀ se calcularon por la división de IC₅₀ de lopinavir contra el VIH-I de la muestra de plasma del paciente por la IC₅₀ para lopinavir contra la cepa viral de referencia NL4-3 (Acceso a GenBank N.º AF324493).

A fin de definir los cambios genotípicos correlacionados con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir, se analizaron las secuencias de aminoácidos completas de las proteasas de VIH-1 en cada una de las muestras de los pacientes. Las mutaciones se compararon con la secuencia de proteasa de la cepa de referencia NL4-3 (Acceso a GenBank N.º AF324493). Ochenta y cuatro de las noventa y nueve posiciones de aminoácidos presentaron al menos una muestra con una mutación (Tablas 2 y 3). En las 2038 muestras de los datos de entrenamiento, hubo 61 posiciones que estaban mutadas en 1% o más de las muestras (es decir, más de 20 muestras), dejando 38 posiciones con mutaciones en 20 o menos muestras (menos de 1% de las muestras). Estos datos se listan en las Tablas 2 y 3. La Tabla 1 proporciona una lista de mutaciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir. Los datos de la Tabla 1 se obtuvieron con el conjunto de datos de entrenamiento completo de las 2038 muestras o con un conjunto de datos de 1418 muestras (indicado con un *), después de la eliminación de las muestras sin ninguna mutación primaria asociada con los inhibidores de proteasa y sin veces de cambio de IC₅₀ (“FC”) mayor de dos para ningún inhibidor de proteasa (Ejemplo 5). El método usado para calcular los valores de P se describe en el Ejemplo 5.

6.2 Ejemplo 2: Correlación de susceptibilidad de lopinavir con el número de mutaciones en la proteasa de VIH-1

Este ejemplo demuestra que un simple algoritmo que correlaciona el número de mutaciones de igual ponderación en el gen de proteasa de un VIH-1 con su susceptibilidad al es impreciso.

Se analizó un conjunto de datos de 2038 muestras de plasma de paciente y se identificaron las mutaciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir, como se describe en el Ejemplo 1. La susceptibilidad fenotípica a lopinavir (veces de cambio con lopinavir) se analizó en función del número de mutaciones en la proteasa del VIH-1 presente en una muestra de plasma del paciente. Las veces de cambio para cada muestra se calculó por la división de la IC₅₀ de lopinavir contra el VIH-1 de la muestra de plasma del paciente por la IC₅₀ para lopinavir la cepa viral de referencia NL4-3 (Acceso a GenBank N.º AF324493). Los datos del genotipo se obtuvieron por la secuenciación de la proteasa del VIH-1 presente en cada muestra del paciente y la determinación de los cambios de secuencia con respecto a la secuencia del VIH NL4-3 (Acceso a GenBank N.º AF324493). La secuencia de aminoácidos para la proteasa NL4-3 se proporciona en la SEQ. ID. No. 1 (Figura 12A) y la secuencia de ácidos nucleicos para el gen de proteasa de NL4-3 se proporciona en la SEQ. ID. No. 2 (Figura 12B).

La Figura 2 muestra la resistencia a lopinavir (Log x veces de cambio de lopinavir) en función del número de las

mutaciones asociadas con la resistencia. Las muestras con las mezclas de aminoácidos se trataron como mutantes. Las mutaciones usadas en este análisis fueron las que se identificaron en el estudio Kempf (Kempf et al., 2001, J. Virol. 75:7462-69). A fin de demostrar claramente las deficiencias de un algoritmo propuesto por Kempf, que intentó predecir la susceptibilidad fenotípica al lopinavir sobre la base del número de mutaciones observadas en 11 posiciones identificadas en la proteasa de VIH, el gráfico para este análisis se dividió en cuatro cuadrantes. El estudio de Kempf postuló que VIH fue sensible al tratamiento con lopinavir si este presentaba cinco o menos mutaciones en estas 11 posiciones, pero si el número de estas mutaciones era seis o más, entonces se predijo que el virus es resistente al tratamiento con lopinavir. El cuadrante inferior izquierdo corresponde a los virus que contienen 5 o menos mutaciones en sus proteasas y que son fenotípica y genotípicamente sensibles (PT-S, GT-S) a lopinavir. Se hallaron 1109, o 54% de las 2038 muestras en este cuadrante. El cuadrante derecho superior corresponde a los virus que contienen seis o más mutaciones y son fenotípica y genotípicamente resistentes (PT-R, GT-R) a lopinavir (Log X veces cambio de lopinavir ≥ 1) y contenían 637 o 31 % de las muestras. Sin embargo, los otros dos cuadrantes corresponden a las "excepciones" donde se predijo sobre la base del genotipo (número de mutaciones) que un virus es susceptible, pero fue fenotípicamente (basado en Log X veces cambio de lopinavir) resistente (superior izquierdo, PT-R, GT-S) o donde se predijo que un virus es resistente sobre la base de un genotipo, pero fue fenotípicamente (basado en Log X veces cambio de lopinavir) sensible (inferior derecho, PT-S, GT-R).

La Figura 2 muestra que las 182 muestras, correspondientes a 9% del conjunto de partida, con dos a cinco mutaciones, en contra de las expectativas, se hallan en el cuadrante izquierdo, superior (PT-R, GT-S) y exhiben valores de IC_{50} como máximo 10 a 100 veces más altos que la IC_{50} para la cepa de referencia (log veces de cambio es 1-2). A la inversa, algunos virus que tenían seis, siete u ocho mutaciones no presentaron una resistencia mayor que la cepa WT, y por lo tanto aparecen en el cuadrante derecho, inferior (FT-S, GT-R) (110 muestras (5%)).

En consecuencia, es evidente a partir de la Figura 2 que una correlación simple de la susceptibilidad a lopinavir con el número de mutaciones de la proteasa de VIH-1 está lejos de ser exacta.

6.3 Ejemplo 3: Reducción del tamaño del grupo discordante PT-S, GT-R

Este ejemplo demuestra que los datos de PT-S, GT-R observados en la Figura 2 se pueden explicar por la presencia de muestras que contienen mezclas de aminoácidos en al menos en una posición asociada con resistencia al lopinavir.

Usando el algoritmo simple del Ejemplo 2 se produjeron aproximadamente 9% de resultados en el cuadrante izquierdo, superior ("PT-R, GT-S") y 5% de resultados en el cuadrante derecho, inferior ("PT-S, GT-R") (Figura 2). Estos resultados discordantes se pueden atribuir, al menos en parte, a las muestras de paciente que contenían una mezcla de cepas virales con proteasas que tenían una mezcla de residuos de aminoácidos en una o más posiciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir. Cuando estas muestras (es decir, las muestras que contenían una mezcla de ambas, una tipo salvaje y una mutante) se excluyeron del análisis, los resultados de PT-S, GT-R disminuyeron a 2% mientras que el número de resultados de PT-R, GT-S permaneció aproximadamente igual a 10% (Figura 3). Se usaron 1402 muestras en este análisis modificado.

Sin estar ligado a ninguna teoría particular, esto se puede explicar con la siguiente hipótesis. El estudio trató las muestras que contenían mezclas de cepas virales como mutantes. Esto pudo, en consecuencia, haber producido el tratamiento de una muestra que contenía 10% de virus mutantes (que contienen una mutación asociada a resistencia) y 90% de virus no mutado o de referencia como una mutante. Debido a la pequeña población de virus mutantes, la muestra total no puede exhibir tanta resistencia fenotípica como era de esperar si la muestra contenía 100% de mutante. Sin embargo, para los fines genotípicos, la muestra se trata como portadora de una mutación. Tales muestras en consecuencia pueden llevar a la observación de menor resistencia fenotípica que la esperada para una muestra con 100% de mutante. Esto genera datos que se hallan en el cuadrante derecho, inferior donde la población es genotípicamente resistente (GT-R), pero fenotípicamente sensible (PT-S).

La remoción de las muestras que contienen mezclas de aminoácidos en una o más posiciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir claramente redujo los resultados PT-S, GTR, por ende se muestra el vínculo entre los dos.

6.4 Ejemplo 4: Análisis del grupo discordante PT-R, GT-S

Este ejemplo demuestra que ciertas mutaciones realizan una mayor contribución a la resistencia a lopinavir que otras.

Las muestras del cuadrante PT-R, GT-S de la Figura 2 corresponden a virus con cinco o menos mutaciones en la proteasa de VIH asociada con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir. Estos virus son fenotípicamente resistentes (presentaron veces de cambio mayor del 10) pero se predijo que eran genotípicamente sensibles (porque ellos tenían cinco o menos mutaciones). Sin estar ligado por teoría particular alguna, esto se puede explicar porque algunas mutaciones contribuyen más significativamente a la resistencia a lopinavir que otras mutaciones. Algunas de estas mutaciones incluso pueden conferir tanta resistencia a lopinavir como cuatro o cinco de las otras mutaciones asociadas a lopinavir. Cuando estas mutaciones más significativas están presentes junto con uno, dos, tres o cuatro

mutaciones asociadas con lopinavir diferentes, la resistencia total conferida puede ser suficientemente grande para hacer que los virus que sean fenotípicamente resistentes.

Las mutaciones que se asociaron significativamente con el grupo PT-R, GT-S se observaron en las posiciones 50, 54 y 82. La Tabla 1 proporciona una lista de mutaciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir.

5 Las Figuras 4, 5 y 6 demuestran que cuando las mutaciones más significativas están presentes (las de las posiciones 50, 54 y 82), las veces de cambio de lopinavir es alta y las muestras están principalmente en la mitad superior del gráfico – la mitad que se asocia con aumento de la resistencia fenotípica. Una comparación de las Figuras 2 ó 3 con las Figuras 4, 5 y 6 también demuestra que la mayor parte de las muestras del cuadrante PT-R, GT-S son las que contienen las mutaciones más significativas.

10 En consecuencia, es evidente que los grupos PT-R, GT-S se pueden asociar con la presencia de mutaciones que confieren desproporcionadamente más resistencia a lopinavir que a otros.

6.5 Ejemplo 5: Análisis alternativo de las muestras de paciente para identificar mutaciones asociadas con resistencia

15 Este ejemplo demuestra (1) un método alternativo de analizar muestras de pacientes para identificar mutaciones que se asocian con aumento o con disminución de la susceptibilidad a inhibidores de proteasa tales como lopinavir, (2) que un simple algoritmo que correlaciona el número de mutaciones de igual ponderación en el gen de proteasa de un VIH-1 con su susceptibilidad a lopinavir es inexacto (3) que los datos observados en el cuadrante PT-S, GT-R se pueden explicar por la presencia de muestras que contienen mezclas de aminoácidos en al menos una posición asociada a resistencia de lopinavir; y (4) que ciertas mutaciones realizan una mayor contribución a la resistencia a lopinavir que otras.

20 A fin de determinar la relación entre una secuencia de la proteasa de la cepa VIH-1 y su susceptibilidad al tratamiento con lopinavir, se analizó un conjunto de datos de entrenamiento de 2038 muestras de plasma de paciente en forma genotípica así como fenotípica. A partir del punto inicial de las 2038 muestras, se eliminaron las muestras que no tenían ninguna evidencia de reducción de susceptibilidad al inhibidor de proteasa por genotipo y fenotipo. El criterio fenotípico para esta exclusión fue todas las muestras que tienen LPV FC < 2 y el criterio genotípico fue ausencia de mutaciones en alguna de las siguientes posiciones (primarias): 30, 32, 46, 48, 50, 54, 82 (excepto V82I), 84, 88 ó 90. Esto produjo la eliminación de 620 muestras, dejando un conjunto de datos de 1418 muestras que se analizaron como en el Ejemplo 1.

25 De modo similar a la Figura 2, la resistencia a lopinavir (Log X veces de cambio de lopinavir) se graficó en función del número de las mutaciones asociadas con la resistencia. La Figura 7 muestra un gráfico de los datos obtenidos en este análisis (de 1418 muestras). La Figura 7, al igual que la Figura 2, también contiene datos en los cuatro cuadrantes. De las 1418 muestras analizadas, 45% (637 muestras) fueron PT-R, GT-R, 34% (489 muestras) fueron PT-S, GT-S, 13% (182 muestras) fueron PT-R, GT-S y 8% (110 muestras) fueron PT-S, GT-R.

30 Cuando, como en el Ejemplo 3, las muestras que contienen una mezcla de cepas virales con proteasas que tenían una mezcla de residuos de aminoácidos en una o más posiciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir se excluyeron del análisis, el número de muestras del cuadrante PT-S, GT-R disminuyó a 4% (31 muestras). Este análisis produjo la exclusión de 555 muestras, dejando un total de 863 muestras (Figura 8).

35 Como en el Ejemplo 4, las mutaciones que estaban significativamente asociadas con el grupo PT-R, GT-S se observaron en las posiciones 50, 54 y 82. Las Figuras 9, 10 y 11 demuestran que cuando las mutaciones más significativas (las de las posiciones 50, 54 y 82) están presentes, el nivel de cambio de lopinavir es alto y las muestras están principalmente en la mitad superior del gráfico – la mitad asociada con aumento de resistencia fenotípica. Una comparación de las Figuras 7 u 8 con las Figuras 9, 10 y 11 también demuestra que la mayor parte de las muestras en el cuadrante PT-R, GT-S son las que contienen las mutaciones más significativas.

40 Los valores de P para determinar la significancia estadística de las correlaciones se calcularon de la siguiente manera: para cada mutación el número de muestras del conjunto de datos (en la presente, muestras genotípicamente sensibles de N = conjunto de datos 863) que estaba por debajo o encima 10 veces para LPV se compararon en muestras con o sin la mutación en cuestión. Se construyó una tabla 2x2 y el valor de P se calculó usando la prueba exacta de Fisher. Se muestra un ejemplo para G48V:

G48V	PT-S	PT-R	Valor de P
ausente	275	97	8.87E-19
presente	7	50	

6.6 Ejemplo 6: Primer algoritmo refinado y demostración de su exactitud mejorada

45 Este ejemplo demuestra que se puede construir un algoritmo que reduce la incidencia de los resultados PT-R, GT-S por ponderación diferencial de la contribución de las mutaciones que contribuyen más significativamente a la

resistencia a lopinavir.

Como se describe en el Ejemplo 5, a partir de un conjunto de datos de entrenamiento de 2038 muestras, las muestras sin mutaciones primarias asociadas con los inhibidores de proteasa y las muestras sin veces de cambio de IC₅₀ ("FC") mayor de dos para ningún inhibidor de proteasa se eliminaron, lo que da como resultado un conjunto de datos de 1418 muestras. La exclusión adicional de muestras que contienen una mezcla de cepas virales con proteasas que tenían una mezcla de residuos de aminoácidos en una o más posiciones asociadas con la reducción de la susceptibilidad al lopinavir, produjeron un conjunto de datos final de 863 muestras que se usaron para diseñar un algoritmo que pueda predecir con exactitud la susceptibilidad del VIH a lopinavir al reducir la incidencia de los resultados de PT-R, GT-S.

Las reglas finales se formularon sobre la base de los resultados observados solo en el conjunto de datos de entrenamiento (863 muestras). Las reglas diseñadas a partir del conjunto de datos de entrenamiento luego se analizaron en el conjunto de datos de entrenamiento y un segundo conjunto de muestras ("conjunto de validación"). El conjunto de datos de validación contenía 1022 muestras y excluía cualquiera de las muestras de los pacientes incluidos en el conjunto de datos de entrenamiento. Como en los datos de entrenamiento, las muestras sin evidencia de reducción de la susceptibilidad a los inhibidores de proteasa se eliminaron, dejando 523 muestras. La exactitud de las reglas o algoritmo diseñados de decidió sobre la exactitud con la que se puede determinar la susceptibilidad de los pacientes sobre la base únicamente del algoritmo. Cuando se observaron discrepancias, el algoritmo se modificó para que permaneciera compatible con los resultados observados en el conjunto de entrenamiento.

El algoritmo modificado luego se trató nuevamente con el conjunto de validación. Los resultados observados en la segunda versión fueron mejores que los de la versión inicial. Este proceso se repitió muchas veces y cada versión de los resultados fue al menos tan buena, si no mejor, como la versión anterior.

Las Tablas 4, 5 y 6 proporcionan una síntesis de las reglas aplicadas en cada ronda o versión y los resultados obtenidos en el conjunto de datos de entrenamiento (Tabla 4) y dos conjuntos de validación diferentes (Tablas 5 y 6). La primera columna proporciona el número de ronda o versión. Las próximas cuatro columnas proporcionan, en orden, los números esperados, de acuerdo con el algoritmo, en los grupos PT-S, GT-R, los PT-R, GT-R, los PT-S, GT-S, PT-R, GT-S. Las próximas dos columnas proporcionan el porcentaje de los grupos PT-S, GT-R y PT-R, GT-S. La próxima columna proporciona la concordancia global (la suma de los porcentajes de los grupos PT-R, GTR y los PT-S, GT-S o 100 - (porcentaje de los grupos PT-S, GT-R + PT-R, GT-S)).

La última columna contiene las reglas usadas para esta ronda de ensayo. Cada conjunto de reglas se añade a las reglas precedentes. Algunas mutaciones se ponderaron más alto que otra (por ejemplo, la mayoría de las mutaciones V82 y L54), algunas se eliminaron juntas del análisis (por ejemplo, I54L) y los factores de ponderación de algunas se alteraron en versiones progresivas del algoritmo. En la versión 6, el factor de ponderación para las mutantes V82 aumentó de 1 a 3. En la versión 7, sin embargo, el factor de ponderación para V82T disminuyó nuevamente a 1, porque este no contribuyó a la resistencia a lopinavir tan significativamente como las otras mutantes V82. La Figura 13 muestra el efecto de los diversos aminoácidos (tipo salvaje y mutaciones) en la posición 82. Se puede observar que el efecto de V82T sobre las veces de cambio de lopinavir no es tan grande como el de las otras mutantes V82. Un análisis preliminar de las mutantes IL54 produjo la eliminación de I54L del algoritmo. Sin embargo, el análisis posterior mostró que I54L realiza una contribución significativa a la resistencia a lopinavir (Figura 14). En consecuencia, en la Tabla 7, a I54L se ha asignado un factor de ponderación de 1, aunque no se incluye en el algoritmo que se presenta en la Tabla 4. Sin estar ligado por teoría particular alguna, se eliminó I54L del algoritmo porque es una mutación relativamente rara y en consecuencia no se produce con frecuencia en el conjunto de datos. Debido a que es rara, tiene muy poco o ningún efecto sobre el análisis de una colección grande de muestras, pero cuando está presente en un virus particular o virus de un paciente particular, contribuye significativamente a la resistencia a lopinavir.

A medida que se va desde "inicio" a la versión 10, la concordancia global para los 3 conjuntos de datos aumenta y el porcentaje de datos del grupo PT-R, GT-S disminuye drásticamente; casi 7 veces en el conjunto de datos de entrenamiento y aproximadamente 6 veces en el conjunto de datos de validación.

La Tabla 7 proporciona una lista de ponderaciones o factores de ponderación asignados a cada mutación. Esta tabla se puede usar para predecir si una cepa VIH particular es probable que tenga una reducción de la susceptibilidad al lopinavir. A cada una de las mutaciones de proteasa listadas en la Tabla 7 que se detectan en la cepa se asigna un factor de ponderación de acuerdo con la Tabla 7. Los factores de ponderación luego se añaden para obtener una puntuación total para el VIH. Si la puntuación total es 6 o más, luego es probable que el VIH sea resistente al tratamiento con lopinavir y si la puntuación total es menor de 6, luego es probable que el VIH sea sensible al tratamiento con lopinavir.

55 **6.7 Ejemplo 7: segundo algoritmo refinado y demostración de su eficacia mejorada**

Este ejemplo demuestra que es posible construir un algoritmo que reduce la incidencia de los resultados de PT-R, GT-S y PT-S, GT-R por el hecho de ajustar el puntaje total requerido para que una cepa de VIH en particular sea considerada genotípicamente resistente o sensible al tratamiento con lopinavir.

Se analizó un conjunto de datos combinados de 2195 muestras, es decir un conjunto de datos consistentes en el “conjunto de datos de entrenamiento” y el “conjunto de datos de validación”. Se excluyeron las muestras que no tenían una mutación primaria asociada con la resistencia fenotípica a los inhibidores de proteasa, no estaban correlacionadas a un cambio de X veces el IC50 (“FC”) mayor de dos para ningún inhibidor de proteasa, o que contenían una mezcla de cepas virales que tenían proteasas con diferentes residuos de aminoácidos en una posición asociada con una susceptibilidad reducida frente al lopinavir si la mezcla incluía el aminoácido hallado en la posición en la cepa de NL4-3 HIV. Se utilizó un conjunto final de datos de 1.099 muestras para alterar el algoritmo descrito en el Ejemplo 6 de manera de mejorar su concordancia global.

Se utilizaron los mismos factores de ponderación enumeradas en la Tabla 7. En el algoritmo cambiado, el valor de corte fue cambiado del 6 a 8, es decir si el puntaje total para un VIH particular era de 8 o mayor, entonces el VIH era fenotípicamente resistente al tratamiento con lopinavir, y si el puntaje total era inferior a 8, entonces el VIH era genotípicamente sensible al tratamiento con lopinavir. Mediante la utilización de un valor de corte de 8, la concordancia global, 90,5%, era superior al observado con un valor de corte de 6 (Tabla 8). En la Figura 5 se provee un diagrama de dispersión en el que se utiliza un valor de corte igual a 8. Puede observarse la reducción en los resultados de PT-R, GT-S y PT-S, GTR comparados con las Figuras 2 y 7. Se observó una concordancia global aún más elevada, de 91,5%, cuando en el algoritmo se utilizó un valor de corte igual a 7 (Tabla 8). Esto puede observarse en la Figura 16.

6.8 Ejemplo 8: efecto de las mutaciones asociadas con la resistencia contra el amprenavir sobre la resistencia contra el lopinavir

Este ejemplo demuestra que determinadas mutaciones correlacionadas con un incremento en amprenavir (“APV”) del VIH también estaban correlacionadas con una mayor resistencia frente al lopinavir.

La Figura 17 muestra el efecto de las mutaciones de proteasa asociadas en el VIH con la resistencia frente al amprenavir (“APV”) sobre la resistencia frente al lopinavir. Unos aislados de VIH-1 con una susceptibilidad disminuido frente al amprenavir fueron seleccionados in vitro y obtenidos de pacientes tratados con amprenavir. Los análisis genotípicos de estos aislados mostraron que la resistencia al APV está asociada con 8 mutaciones en el gen de proteasa de VIH-1: 5 primarias (V321, I50V, I54UM, y I84V) y 3 secundarias (M46I/L y I47V). Ver Maguire et al., 2002, Antimicrob Agents Chemother 46:731-738. Sin excepción, cada una de estas mutaciones esta correlacionada con una menor susceptibilidad frente al lopinavir (Tabla 1). V32I y I47V también son conocidos por ser seleccionados por LPV in vitro. Carrillo et al., 1998, J. Virol. 72:7532-41. El efecto de estas mutaciones y de las combinaciones de estas mutaciones entre sí y de I84V sobre la susceptibilidad al 1PV y APV se muestra en la Tabla 9. La FC mediana para APV era de 9,5 veces o superior en cada grupo, como cabía prever. Sin embargo, los LPV FC mediano frecuentemente eran paralelos, y era frecuentemente superior que la del APV. Esta observación condujo a la investigación del grado de resistencia cruzada entre estos dos inhibidores de proteasa.

De una lista de 26 mutaciones asociadas con APV FC $\geq 2,5$ basados en un análisis univariante, 23 estaban también asociados con un LPV FC $\geq 2,5$ (Tabla 10). Mediante el uso del análisis de regresión, se analizó la correlación entre FC (Qog-transformed) para ambos. La Figura 18 muestra un diagrama de dispersión bivalente de cambios de X veces el lopinavir (“Log LPV FC”) versus cambios X veces de amprenavir (“Log APV FC”). Los puntos más oscuros (“APV GT-R” en las leyendas) representan aquellas muestras que eran genotípicamente resistentes al amprenavir y los puntos más claros (“APV GT-S” en las leyendas) representan aquellas muestras que eran genotípicamente sensibles al amprenavir. La Figura 18 muestra que la correlación entre amprenavir y lopinavir es más elevada para aquellas muestras que son genotípicamente resistentes al amprenavir (coeficiente de correlación, $R^2 = 0,52$) que para aquellas que son genotípicamente sensibles al amprenavir (coeficiente de correlación, $R^2 = 0,39$) (todas las muestras con FC $< 2,5$ para cualquier inhibidor de proteasa fueron excluidas para este análisis). El 66% de todas las muestras, y el 82% de las muestras de AV GT-R, que eran PT-R para cualquier inhibidor de la proteasa, eran resistentes a ambos. Si bien el 95% de las muestras definidas como GT-R eran también PT-R, el 80% eran también PT-R para LPV (Tabla 11).

A pesar de la correlación, la presencia de mutaciones solamente no era suficiente para LPV FC > 10 , refiriéndose la acumulación de 8 o más mutaciones con respecto a aquellas asociadas con una susceptibilidad reducida a LPV listadas en la Tabla 1.

Los ejemplos provistos en la presente, tanto actuales como proféticos, son meramente formas de realización de la presente invención, y no tienen por objeto limitar la invención de ninguna manera.

TABLA 1

Mutaciones de lopinavir				
Mutación	FC < 10	FC ≥ 10	% R: % S	Valor de P
L10F	16	25	9	< 0,0001
L10F*	15	25	3	0,0001
L10I*	105	97	2	< 0,0001
G16E*	8	23	6	< 0,0001
K20I	21	24	6	< 0,0001
K20I*	14	24	3	0,0001
K20M	6	10	9	< 0,0001
K20M*	4	10	5	0,0045
K20R	17	13	4	0,0002
L24I	7	10	8	< 0,0001
V32I	9	18	11	< 0,0001
V32I*	9	18	4	0,0004
L33IFV**	38	47	7	< 0,0001
L33F*	14	42	6	< 0,0001
E34DKQ**	4	18	25	< 0,0001
E34Q*	2	12	12	0,0001
K43T*	4	22	11	< 0,0001
M46I	49	57	6	< 0,0001
M46L	16	19	7	< 0,0001
M46I*	49	57	2	< 0,0001
M46L*	16	19	2	0,009
M46V*	No disponible	No disponible	No disponible	< 0,0001
I47V*	5	22	8	< 0,0001
I47A	No disponible	No disponible	No disponible	< 0,001
I47V	5	22	25	< 0,0001
G48V	7	50	40	< 0,0001
G48V*	7	50	14	< 0,0001
I50V	1	22	123	< 0,0001
I50V*	1	25	48	< 0,0001
I54A	0	22	N/A	< 0,0001
I54L	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
I54M	6	21	20	< 0,0001
I54S	0	14	N/A	< 0,0001
I54T	0	5	N/A	< 0,0001
I54V	7	47	37	< 0,0001
I54A*	0	22	N/A	< 0,0001

Mutaciones de lopinavir				
Mutación	FC < 10	FC ≥ 10	% R: % S	Valor de P
I54M*	6	21	7	< 0,0001
I54S*	0	14	N/A	< 0,0001
I54T*	0	5	N/A	0,0045
I54V*	7	47	13	< 0,0001
K55R	13	12	5	< 0,0001
Q58E	19	26	8	< 0,0001
Q58E*	18	26	3	0,0003
L63T*	4	11	5	< 0,002
I66FV*	14	12	5	0,0001
A71I	5	7	8	0,0007
G73C	2	6	17	0,0002
G73T	10	13	7	< 0,0001
T74ASP**	27	37	8	< 0,0001
T74S*	14	25	3	0,0001
L76V	1	6	34	< 0,0001
L76V*	1	6	12	0,0076
P79ADE**	3	6	11	0,0006
V82A	14	73	29	< 0,0001
V82F	2	6	17	0,0002
V82A*	14	73	10	< 0,0001
V82S	0	7	N/A	< 0,0001
V82S*	0	7	N/A	0,0005
I84A*	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
I84L*	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
I84V	41	33	4	<0,0001
L89I*	0	5	N/A	0,0045
L89M*	7	13	4	0,0004

Cantidad de muestras de partida = 2.038

* Cantidad de muestras de partida = 1.418 (después de la remoción de muestras sin ninguna mutación primaria asociada con inhibidores de proteasa y sin un cambio de x veces de la IC₅₀ ("FC") mayor que para dos para cualquier inhibidor de proteasa).

** Todas las variantes fueron tratadas igualmente.

N/A: No aplicable (resulta en una división por cero)

FC: Fold Change (cambios x veces) en IC₅₀

%R: por ciento de muestras con mutación comparada con todas las muestras PT-R, GT-S.

%S: por ciento de muestras con mutación comparada con todas las muestras PT-S, GT-S.

TABLA 2

Correlación entre la cantidad de posiciones con la cantidad de muestras con una mutación	
Cantidad de posiciones	Cantidad de muestras con mutaciones
11	0
9	1
3	2
2	3
2	4
3	5
1	6
3	7
0	8
0	9
34	<10
65	>10
61	>20
46	>100
4	10 a 20
15	20 a 100

TABLA 3

Cantidad de muestras vistas con mutaciones en cada posición de proteasa de VIH	
Posición	Cantidad de muestras
P1	0
P9	0
D25	0
G27	0
D29	0
T31	0
P44	0
G78	0
G86	0
L97	0
N98	0
Q2	1
T26	1
A28	1
G49	1
G52	1

Cantidad de muestras vistas con mutaciones en cada posición de proteasa de VIH	
Posición	Cantidad de muestras
V56	1
P81	1
G94	1
F99	1
I3	2
L5	2
G40	2
W6	3
W42	3
R87	4
T96	4
R8	5
G51	5
Y59	5
T80	6
Q7	7
E21	7
G68	7
V75	12
G17	13
L38	17
L23	20
T4	24
A22	24
N83	25
E65	33
P79	39
T91	39
K45	45
L76	57
C95	59
P39	61
Q18	63
D30	74
I50	80
N88	89
K70	96

Cantidad de muestras vistas con mutaciones en cada posición de proteasa de VIH	
Posición	Cantidad de muestras
E34	101
I66	103
C67	110
I47	112
V32	116
V11	117
Q92	121
I85	131
L24	134
G16	136
Q61	144
K55	153
G48	156
F53	159
Q58	159
L89	186
T74	202
K43	208
K14	210
H69	213
R57	237
T12	244
D60	247
L19	297
L33	411
G73	416
I64	458
I84	482
I15	489
I72	518
R41	534
I13	556
K20	631
V77	708
E35	735
V82	741
M46	780

Cantidad de muestras vistas con mutaciones en cada posición de proteasa de VIH	
Posición	Cantidad de muestras
I93	823
N37	826
I54	834
M36	841
I62	897
L90	946
A71	1047
L10	1242
L63	1858

TABLA 4

Construcción de algoritmo y aplicación a los datos de entrenamiento								
No	PT-S, GT-R	PT-R, GT-R	PT-S, GT-S	PT-R, GT-S	%PT-R, GT-S	%PT-S, GT-R	Concordancia	Reglas
Inicio	32	412	281	138	16,0%	3,7%	80,3%	Todas las mutaciones pesaban igualmente
1	36	457	277	93	10,8%	4,2%	85,1%	Se añadieron M46V, I50V (peso = 3), I54AMS, I84AL, V82S
6	58	519	255	31	3,6%	6,7%	89,7%	Se añadieron L33F, I47V, G48MV, L63T, se incrementó peso de V82AFST a 3
7	56	517	257	33	3,8%	6,5%	89,7%	Peso de V82T llevado de regreso a 1
8	57	522	256	28	3,2%	6,6%	90,2%	Añadir V32I, E34Q, K43T, L89IM, retirar I54L
10	65	530	248	20	2,3%	7,5%	90,2%	Añadir 58E, 74S, 76V, Incrementar peso de 54 a 3x

TABLA 5

Aplicación de algoritmo al conjunto 1 de datos de validación								
No.	PT-S, GT-R	PT-R, GT-R	PT-S, GT-S	PT-R, GT-S	% PT-R, GT-R	% PT-S, GT-R	Concordancia general	
Inicio	37	130	302	54	10,3 %	7,1 %	82,6 %	
1	38	140	301	44	8,4 %	7,3 %	84,3 %	
10	66	175	273	9	1,7 %	12,6 %	85,7 %	
Cantidad de muestras en el conjunto de datos = 523								

TABLA 6

Aplicación de algoritmo al conjunto 2 de datos de validación							
No.	PT-S, GT-R	PT-R, GT-R	PT-S, GT-S	PT-R, GT-S	% PT, R-GT-R	% PT-S, GT-R	Concordancia general
Inicio	8	86	172	41	13,4 %	2,6 %	84,0%
1	8	94	172	33	10,7 %	2,6 %	86,6 %
10	25	120	155	7	2,3 %	8,1 %	89,6 %

Cantidad de muestras en el conjunto de datos = 307 (después de la remoción de muestras que contienen mezclas de aminoácidos en cualquiera de las posiciones asociadas con una susceptibilidad reducida al Ioponavir a partir de del conjunto de datos de partida de 523 muestras de la Tabla 7).

TABLA 7

Factores de ponderación

Mutación	Factor de ponderación	Mutación	Factor de ponderación
L10F	1	I54M	3
L10I	1	I54S	3
G16E	1	I54T	3
K20I	1	I54V	3
K20M	1	K55R	1
K20R	1	Q58E	1
I24I	1	L63T	1
V32I	1	A71I	1
L33F	1	L76V	1
E34Q	1	V82A	3
K43T	1	V82F	3
M46I	1	V82S	3
M46L	1	V82T	1
M46V	1	I84A	1
I47V	1	I84L	1
G48V	1	I84V	1
I50V	3	L89I	1
L54A	3	L89M	1
L54L	1		

TABLA 8

Análisis de conjuntos de datos combinados

Valor de corte	PT-S, GT-R	PT-S, GT- S	PT-R, PT-R	PT-R, GT-S	Concordancia general
6	93	404	589	13	90,4%
7	63	434	572	30	91,5%
8	50	447	548	54	90,5%

TABLA 9

EFFECTO DE LAS MUTACIONES APV SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD AL LPV Y AL APV

Grupo de genotipo	n	LPV FC mediana	APV FC mediana
Tipo salvaje (todas las posiciones primarias)	623	0,6	0,6
Que no contienen ninguna mutación ensayada	1096	2,1	1,6
32	26	12	9,5
47	8	191	26
50	42	54	20
54 ^a	9	160	22
84	247	7,1	11
32, 47	23	7,5	12
32, 84	3	124	51
46 ^b , 54	16	138	84
47, 54	3	88	42
47, 84	4	28	12
54, 84	22	93	67
32, 47, 54	17	146	40
46, 54, 84	29	30	47
47, 54, 84	3	20	24
32, 46, 47, 54	4	208	130
32, 47, 54, 84	5	227	130
32, 46, 47, 54, 84	6	200	130

^a I54L o M solamente

^b M46I o L.

TABLA 10**MUTACIONES ASOCIADAS CON APV Y LPV > 2,5**

APV	APV/LPV
10F	10F
11	11
23	
32I	32I
33F	33F
34Q	34Q
43T	43T
47V	47V
48M	48M
50V	50V
53L	53L
54A	54A
54L	54L
54M	54M
54S	54S
54T	54T
55	55
58E	58E
66	
71L	71L
76V	76V
79	79
82F	82F
84V	84V
92	
95	95

Mutaciones con % R: % S > 5 y P > 0,01, para FC > 2,5

TABLA 11

RESUMEN DE ESTADÍSTICAS PARA LA RESISTENCIA CRUZADA A LPV-APV		
Categoría	Porcentaje de muestras	
	Todos ^a	APV GT-R
APV FC > 2,5 también LPV FC > 10	82	83
LPV FC > 10 también APV FC > 2,5	91	99
PT-R para sea PI PT-R para ambos	76	82
APV FC > 2,5	61	95
LPV FC > 10	55	80
^a muestras sin inhibidor de proteasa FC > 2 y sin inhibidor de proteasa mutaciones primarias excluidas; n = 1.099		

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Petropoulos, Christos
 Parkin, Neil
 Chappey, Clolombe

5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE UN VIRUS PATÓGENO A INHIBIDORES DE PROTEASA

<130> 11068-026-228

<150> US 60/357,171

<151> 15-02-2002

10 <150> US 60/359,342

<151> 22-02-2002

<150> US 60/392,377

<151> 26-06-2002

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 99

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana

20 <400> 1

Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg Pro Leu Val Thr Ile Lys Ile Gly
 1 5 10 15

Gly Gln Leu Lys Glu Ala Leu Leu Asp Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val
 20 25 30

Leu Glu Glu Met Asn Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly
 35 40 45

Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile
 50 55 60

Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr
 65 70 75 80

Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr
 85 90 95

Leu Asn Phe

<210> 2

<211> 297

<212> ADN

25 <213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 2

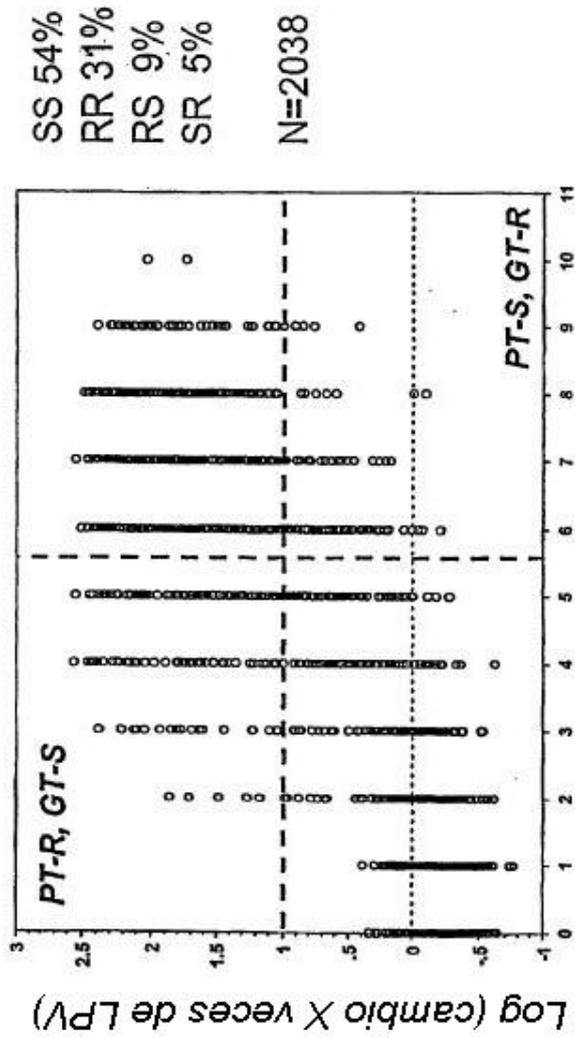
ES 2 381 866 T3

cctcagatca	ctctttggca	gcgaccctc	gtcacaataa	agataggggg	gcaattaaag	60
gaagctctat	tagatacagg	agcagatgat	acagtattag	aagaaatgaa	tttgccagga	120
agatggaaac	caaaaatgat	agggggaatt	ggaggtttta	tcaaagtaag	acagtatgat	180
cagatactca	tagaaatctg	cggacataaa	gctataggta	cagtattagt	aggacctaca	240
cctgtcaaca	taattggaag	aaatctgttg	actcagattg	gctgcácttt	aaatfff	297

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad a un inhibidor de proteasa, que comprende:
- 5 (a) detectar, en dicho VIH, la presencia o ausencia de dos o más de las mutaciones de proteasa de VIH enumeradas en la Tabla 7;
- (b) asignar un factor de ponderación a cada mutación, como se provee en la Tabla 7; y
- (c) añadir dichos factores de ponderación de manera de obtener un puntaje total para dicho VIH,
- en donde el inhibidor de proteasa es lopinavir y en donde dicho VIH tiene una probabilidad incrementada de ser resistente a dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a 6.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho VIH tiene una probabilidad acrecentada de ser resistente a dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a 7, con preferencia, igual o superior a 8.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la mutación se detecta en la proteasa de dicho VIH.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la mutación se detecta en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se determina si un individuo infectado con un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tiene una probabilidad acrecentada de tener una menor susceptibilidad al tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende:
- 20 (a) detectar, en una muestra tomada de dicho individuo, la presencia o ausencia de dos o más de las mutaciones de proteasa de VIH enumeradas en la Tabla 7;
- (b) asignar un factor de ponderación a cada mutación como se provee en la Tabla 7, y
- (c) añadir dicho factor de ponderación de manera de obtener un puntaje total para dicho individuo,
- en donde el inhibidor de proteasa es lopinavir y en donde dicho individuo tiene una probabilidad acrecentada de ser resistente al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a 6.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho individuo tiene una probabilidad acrecentada de ser resistente al tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicho puntaje total es igual o superior a 7, con preferencia, igual o superior a 8.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en donde la mutación se detecta en la proteasa de dicho VIH.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en donde la mutación se detecta en un ácido nucleico de dicho VIH que codifica la proteasa.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho virus de inmunodeficiencia humana es el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).
- 35 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 6 u 8, en donde dicha presencia o ausencia de dicha mutación en dicha proteasa se detecta por hibridación con una sonda de oligonucleótidos específica de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de dicho virus de inmunodeficiencia humana que codifica dicha mutación, en donde la presentación de la hibridación indica dicha presencia o ausencia de dicha mutación.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha sonda de oligonucleótidos específica de secuencia se hibrida en un ácido nucleico que codifica dicha mutación y la presencia de hibridación indica la presencia de dicha mutación.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 6 u 8, en donde dicha presencia o ausencia de dicha mutación en dicha proteasa se detecta mediante secuenciación de ácidos nucleicos.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde el individuo está sometido o ha sido sometido a un tratamiento anterior con dicho inhibidor de proteasa o con un inhibidor de proteasa diferente.
- 45 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la proteasa tiene una secuencia que es al menos el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 1, o preferentemente al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 1.

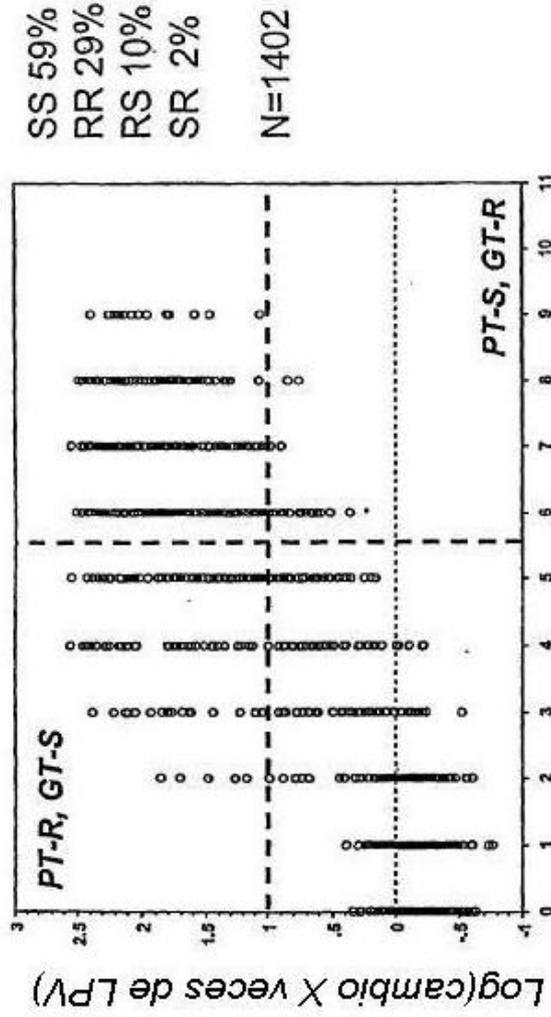
Fenotipo LPV vs. Puntaje de Mutación



*Puntaje de mutación de LPV
 (mezclas contadas como mutantes)*

FIG. 2

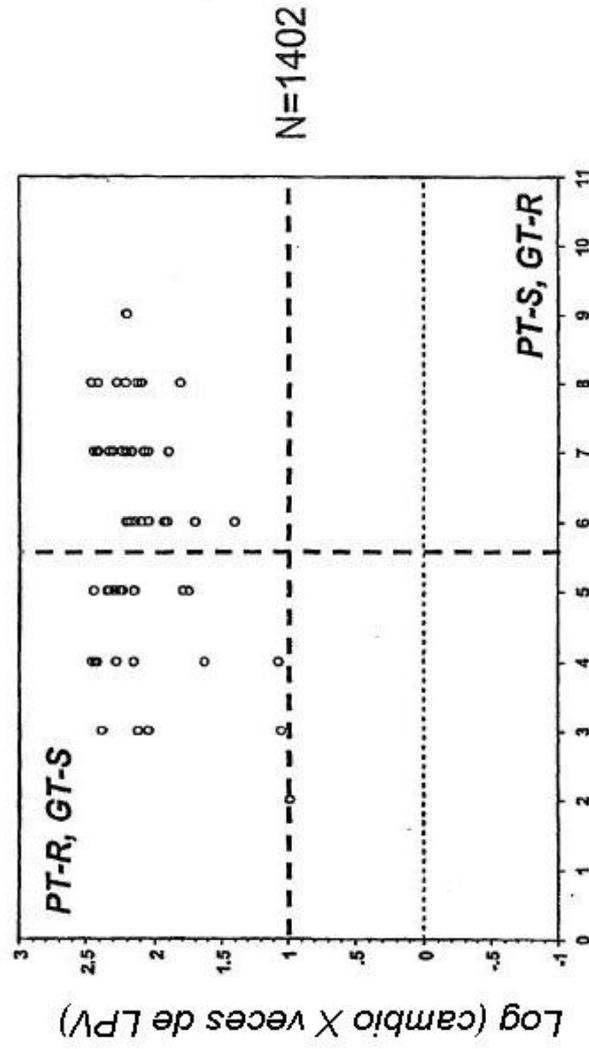
Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación



Puntaje de mutación de LPV

FIG. 3

Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación:
150V



Puntaje de mutación de LPV
FIG. 4

Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación
V82A, F, S, T, O I

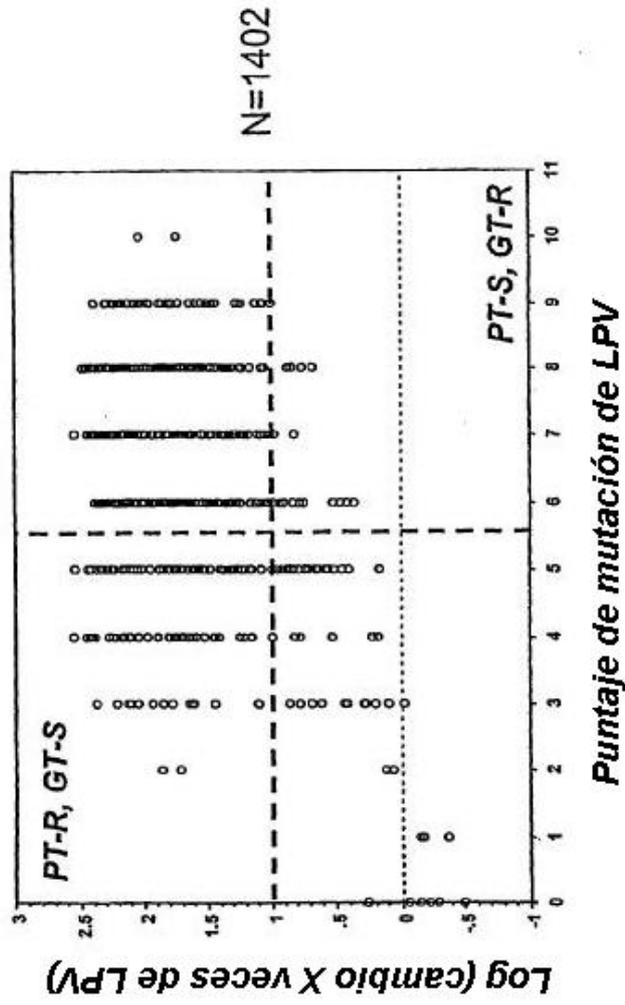


FIG. 5

Fenotipo de LPV vs puntaje de mutación
I54A, L, M, S, T, V

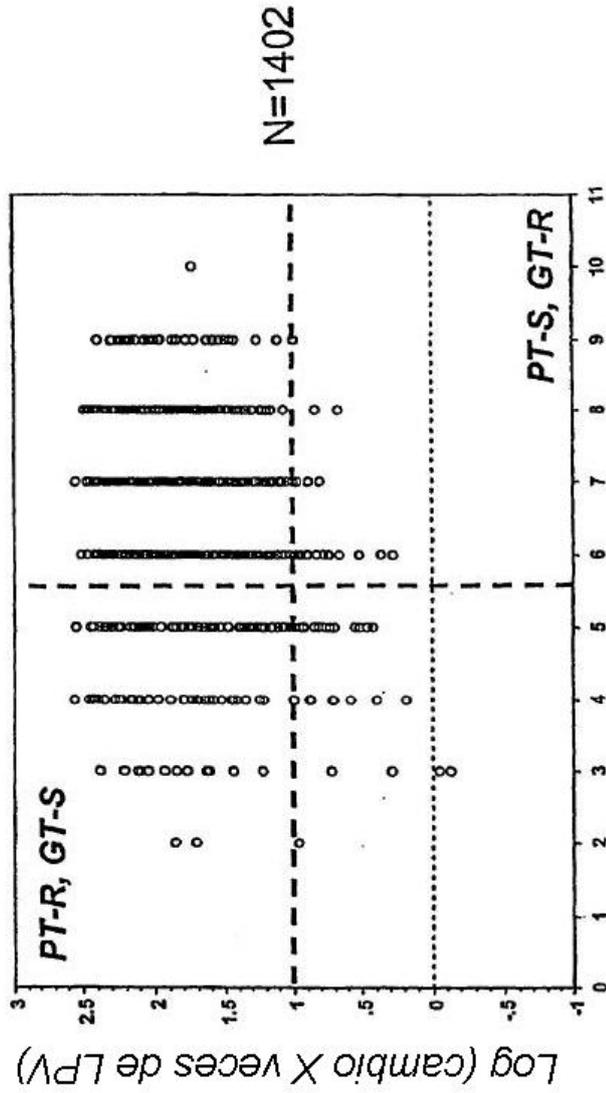


FIG. 6
Puntaje de mutación de LPV

Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación

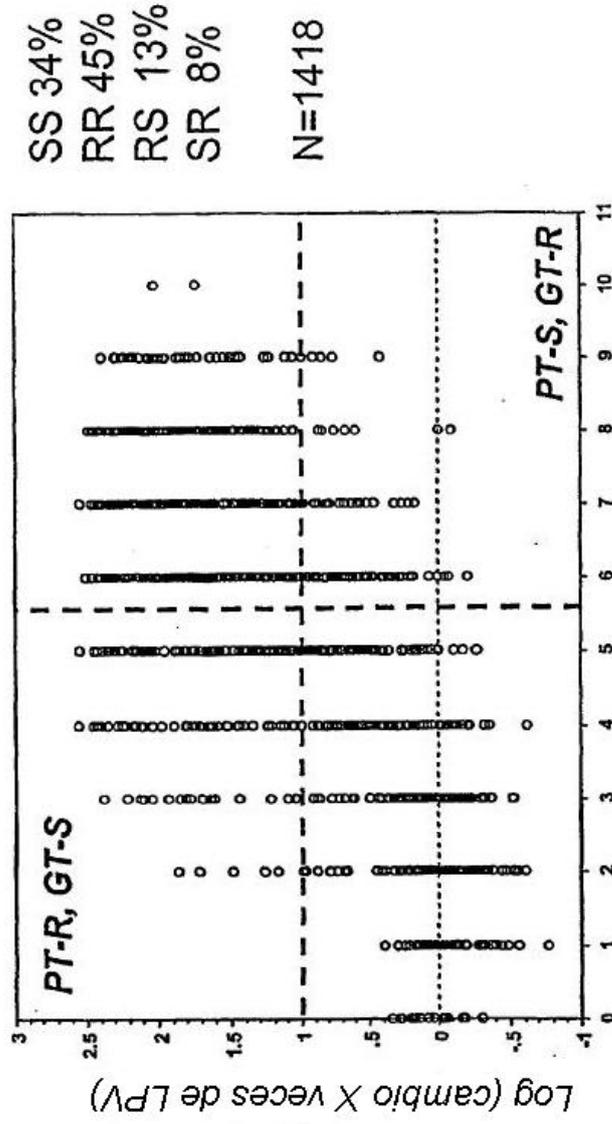
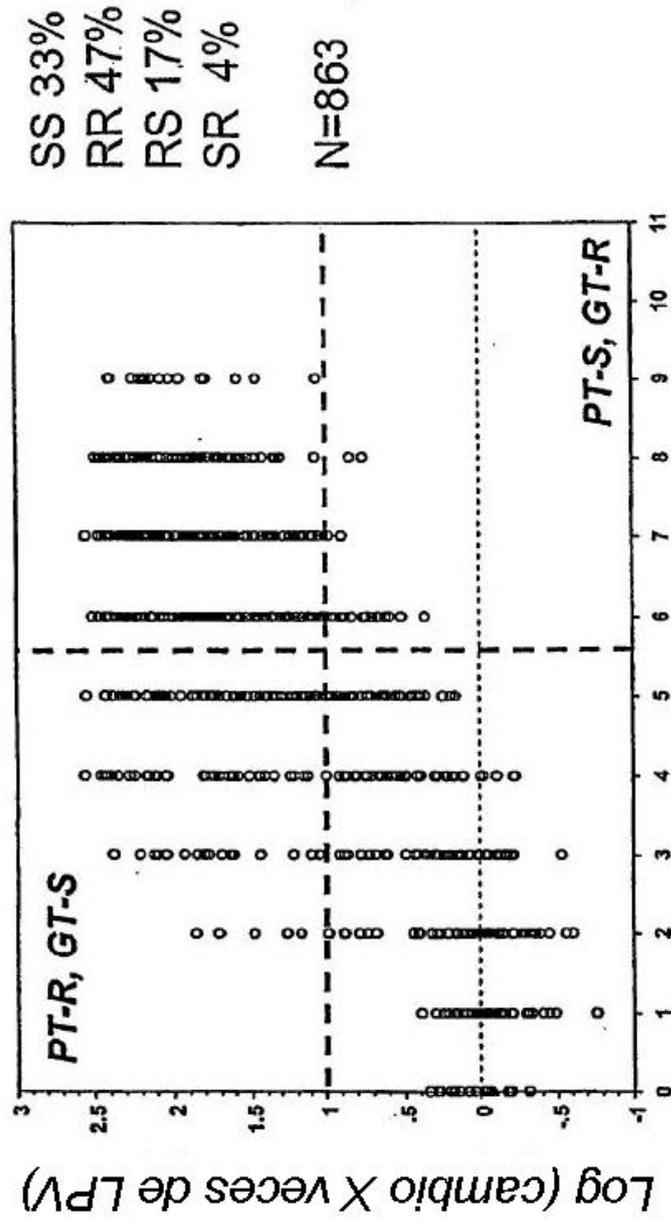


FIG. 7

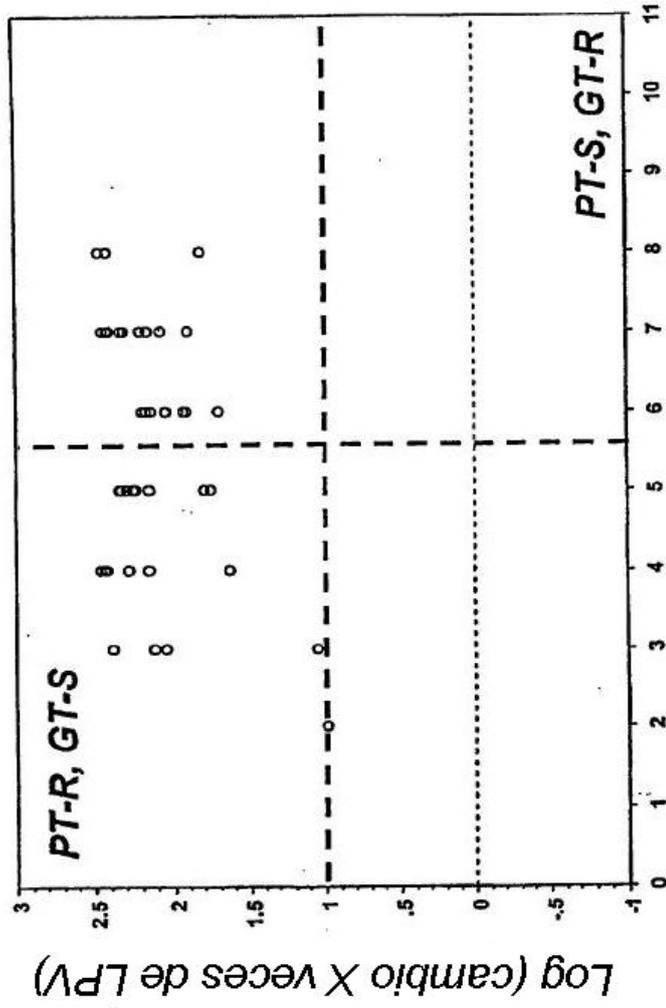
Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación



Puntaje de mutación de LPV

FIG. 8

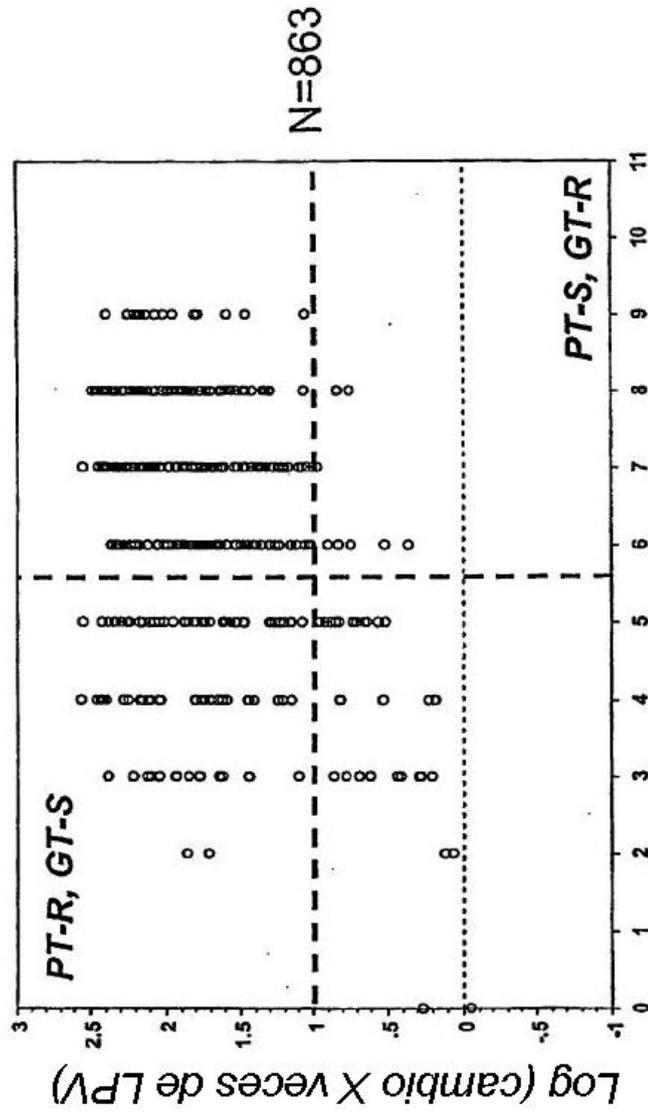
Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación:
150V



Puntaje de mutación de LPV
FIG. 9

Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación:

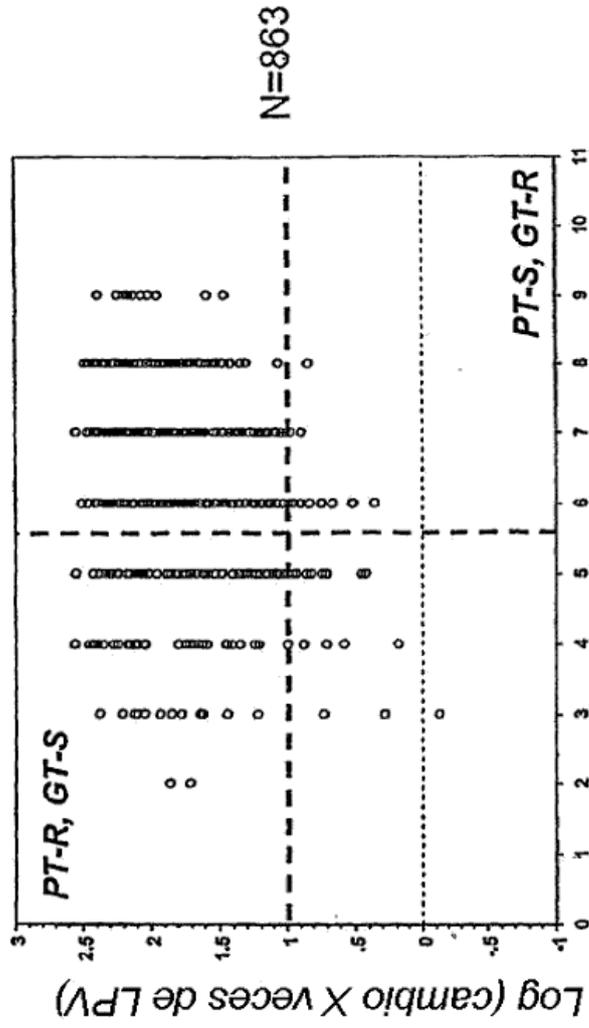
V82A, F, S, T, O I



Puntaje de mutación de LPV

FIG. 10

Fenotipo de LPV vs. puntaje de mutación:
I54A, L, M, S, T, V



Puntaje de mutación de LPV
FIG. 11

FIG. 12

SEQ. ID. NO: 1: Secuencia de aminoácidos de proteasa de VIH NL4-3
PQIILWQRPL VTIKIGGQLK EALLDTGADD TVLEEMNLPG RWKPKMIGGI
GGFIKVRQYD QILIEICGHK AIGTVLVGPT PVNIIGRNLL TQIGCTLNF

SEQ. ID. NO: 2: Secuencia de nucleótidos de gen de proteasa de VIH NL4-3

1-10 CCT CAG ATC ACT CTT TGG CAG CGA CCC CTC
11-20 GTC ACA ATA AAG ATA GGG GGG CAA TTA AAG
21-30 GAA GCT CTA TTA GAT ACA GGA GCA GAT GAT
31-40 ACA GTA TTA GAA GAA ATG AAT TTG CCA GGA
41-50 AGA TGG AAA CCA AAA ATG ATA GGG GGA ATT
51-60 GGA GGT TTT ATC AAA GTA AGA CAG TAT GAT
61-70 CAG ATA CTC ATA GAA ATC TGC GGA CAT AAA
71-80 GCT ATA GGT ACA GTA TTA GTA GGA CCT ACA
81-90 CCT GTC AAC ATA ATT GGA AGA AAT CTG TTG
91-99 ACT CAG ATT GGC TGC ACT TTA AAT TTT

Efecto del aminoácido en la Posición 82

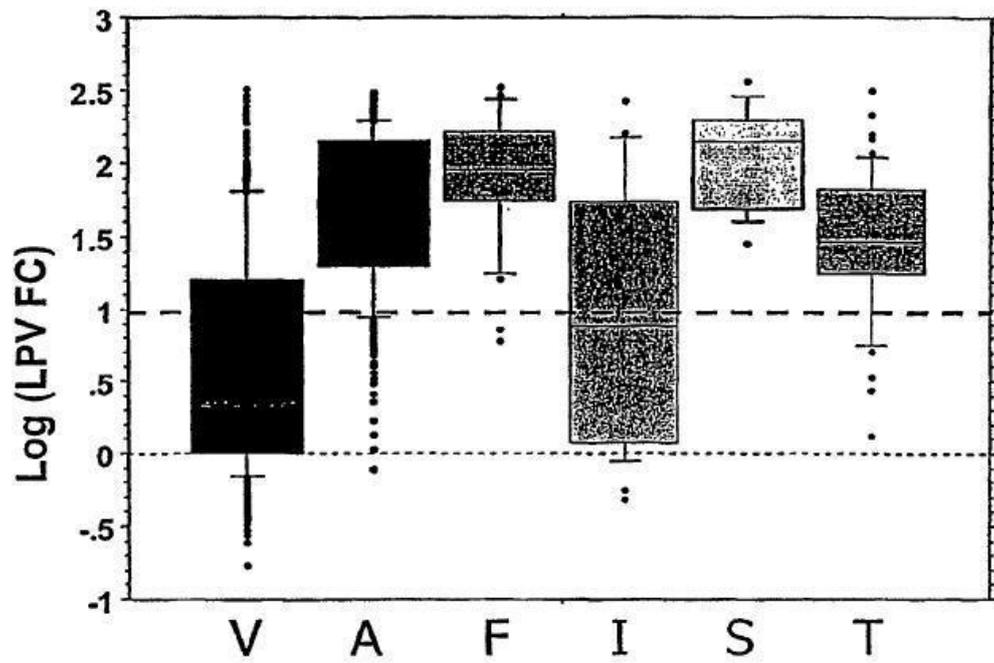


Figura 13

Efecto del aminoácido en la Posición 54

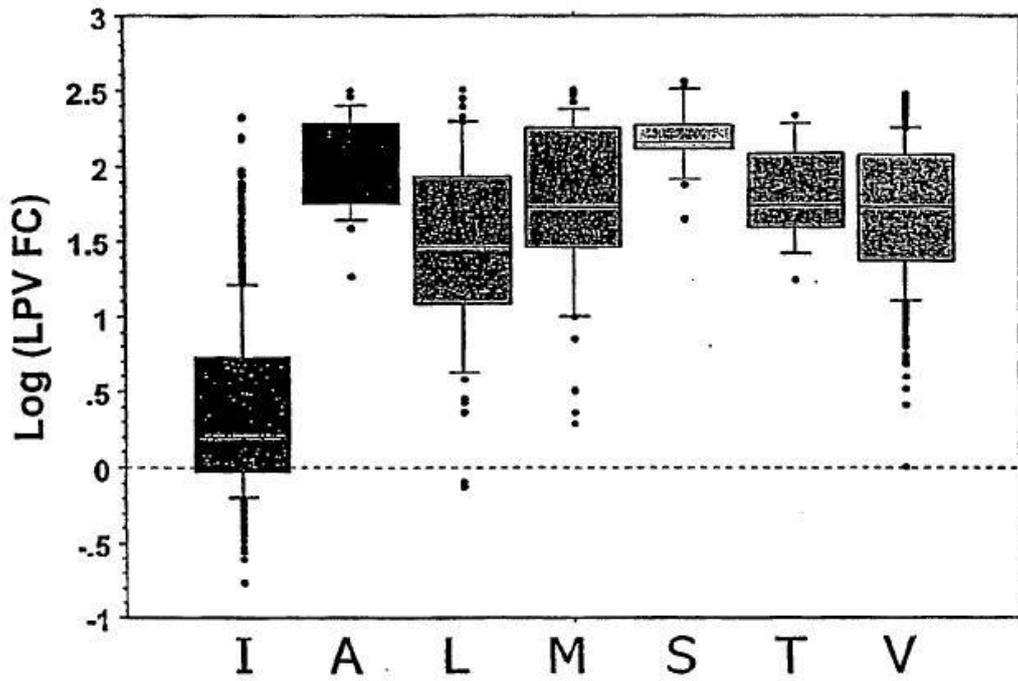
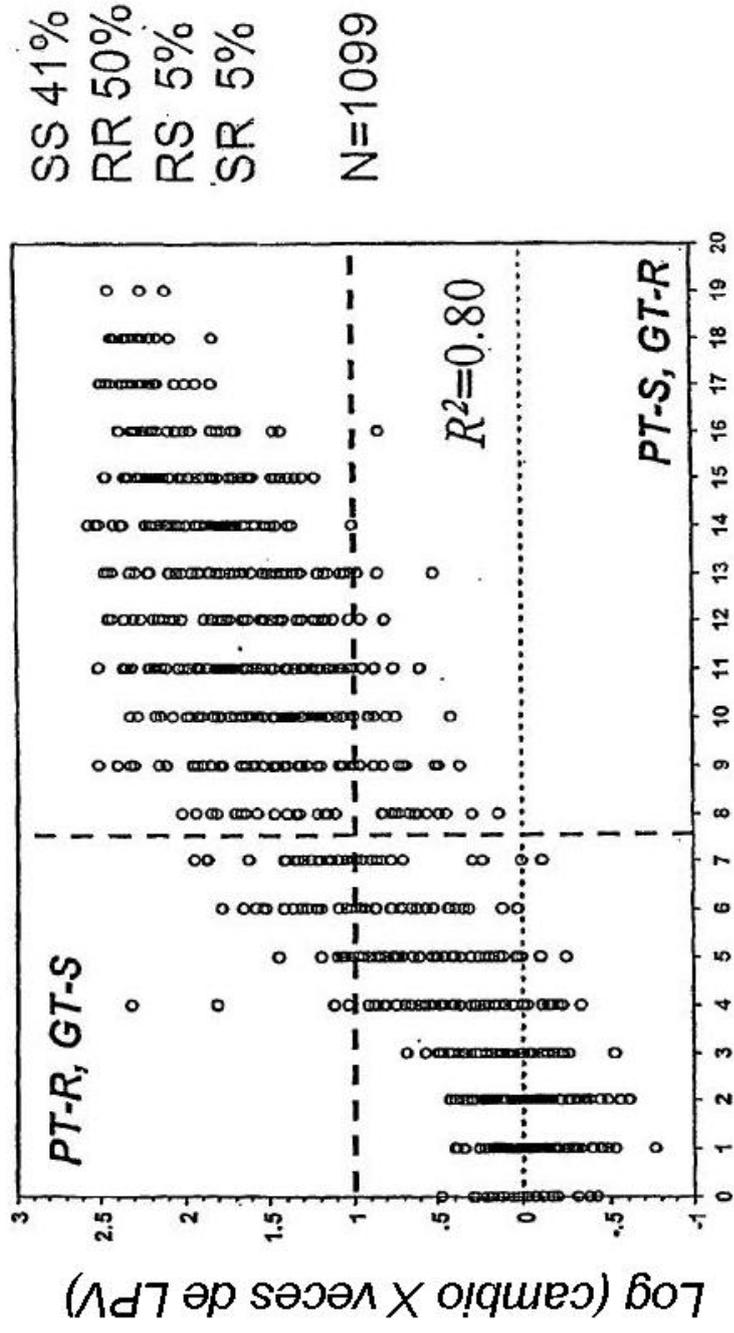


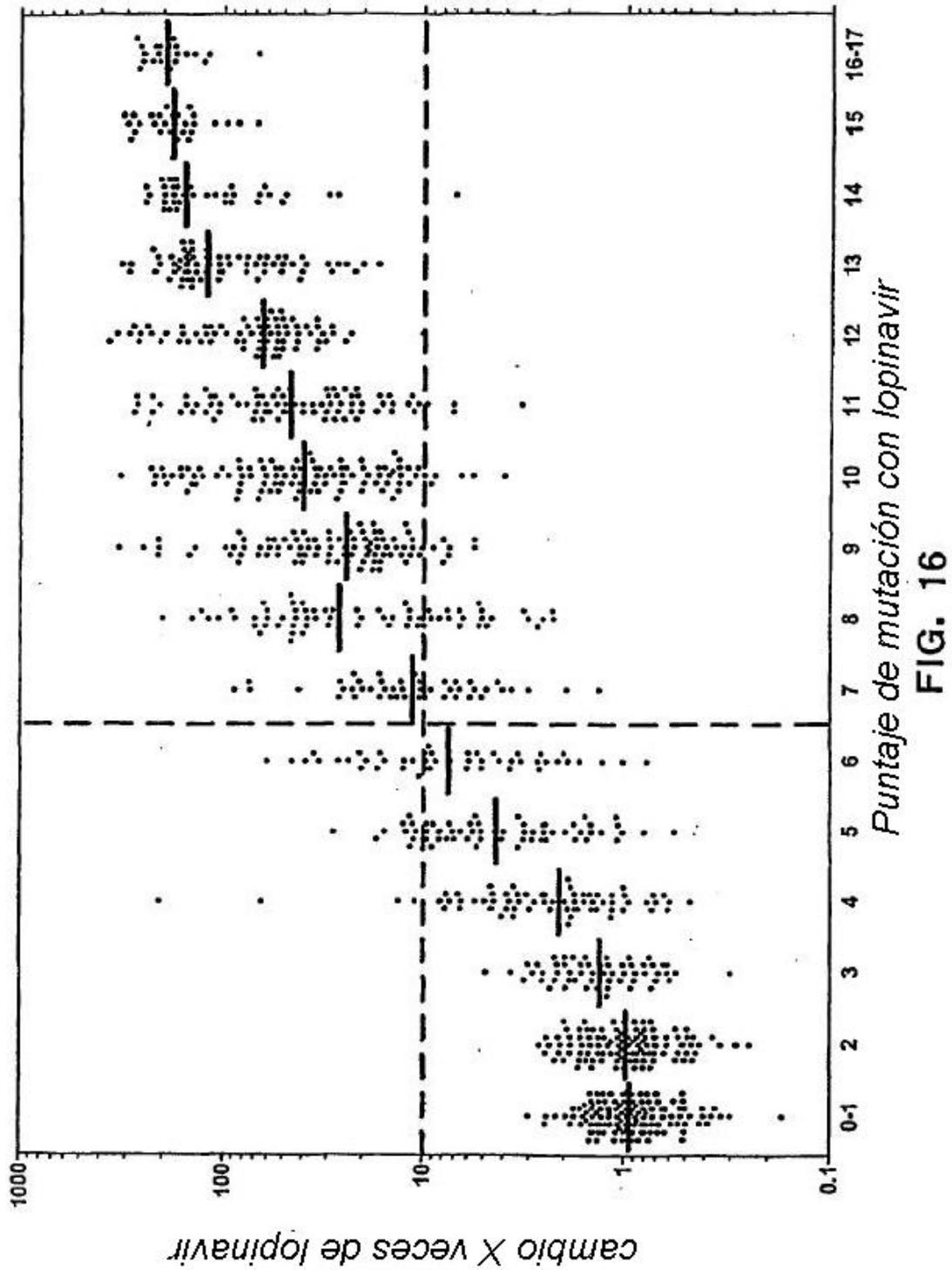
Figura 14

Fenotipo de LPV vs. nuevo puntaje de mutación

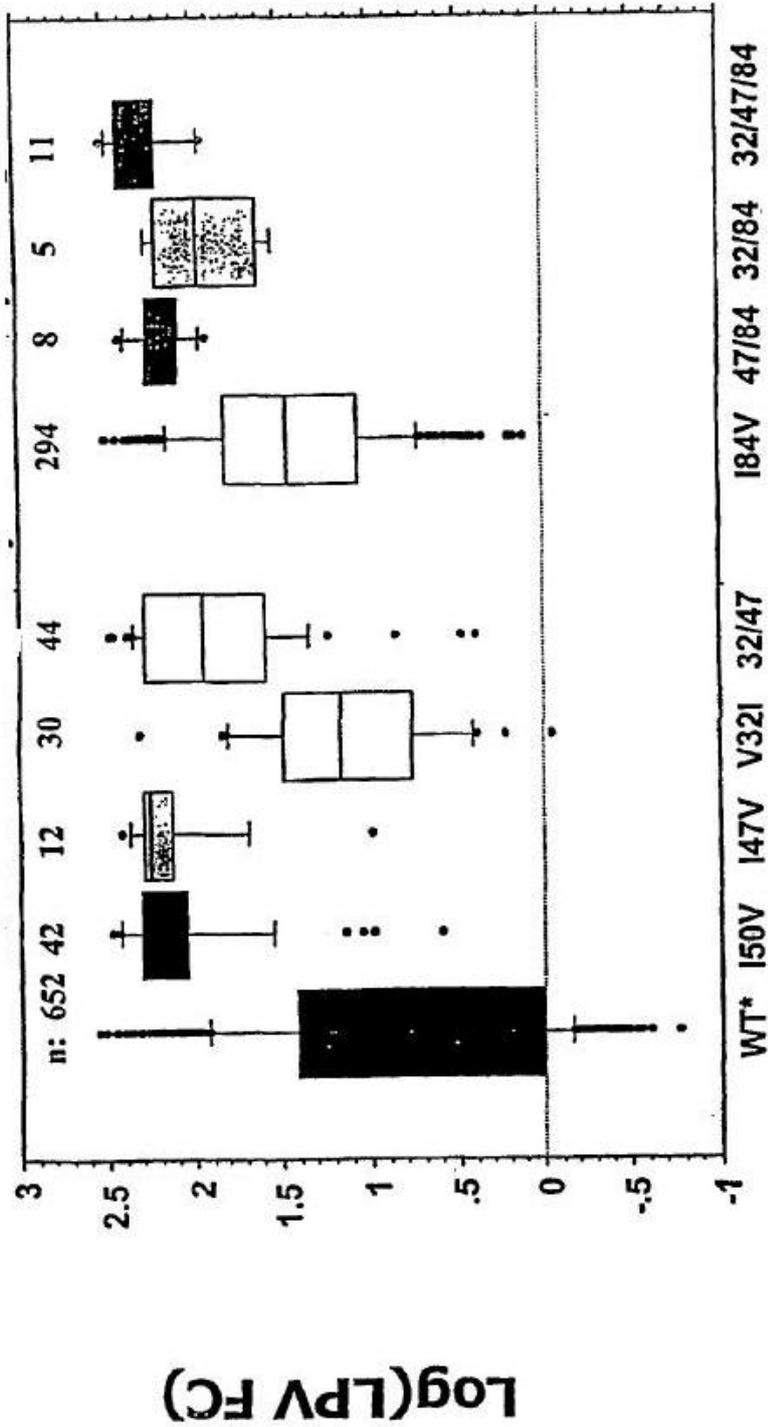


Puntaje de mutación de LPV
(mezclas excluidas del conjunto de datos)

FIG. 15



**EFFECTO DE LAS MUTACIONES CON RESISTENCIA AL APV
(32, 47, 50, 84)**



* WT = sin mutación a 32, 47, 50 ó 84

FIG. 17

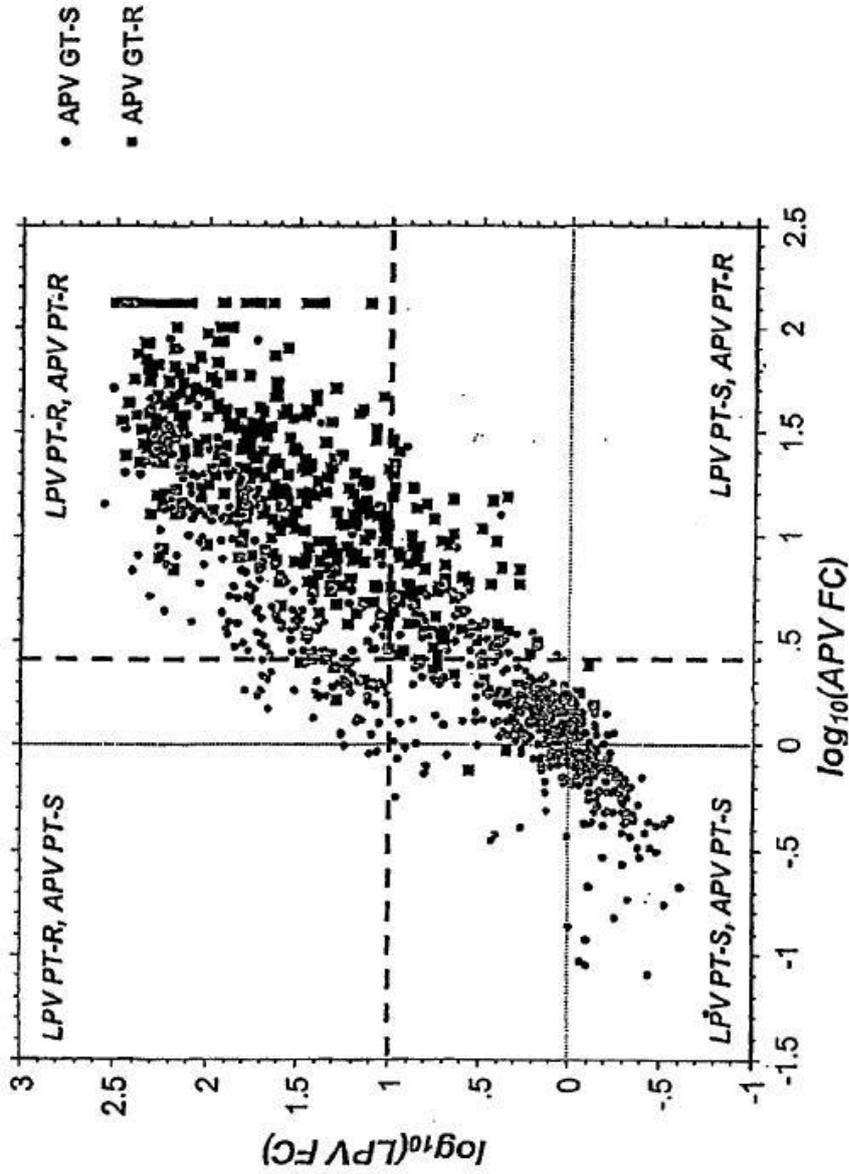


FIG. 18