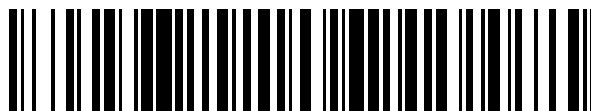


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 563**

51 Int. Cl.:

G06F 19/18 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2007 E 07718079 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1984525**

54 Título: **Método para determinar la resistencia de VIH a tratamiento con inhibidor de proteasa**

30 Prioridad:

19.01.2006 US 760580 P
29.03.2006 US 787550 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2013

73 Titular/es:

MONOGRAM BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
345 OYSTER POINT BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

PARKIN, NEIL T. y
CHAPPEY, COLOMBE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 428 563 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

Método para determinar la resistencia de VIH a tratamiento con inhibidor de proteasa

1. Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos y dispositivos para determinar la susceptibilidad de un virus patogénico a un compuesto anti-viral. En particular, esta invención se refiere a métodos y dispositivos útiles para la identificación de VIH que tiene alterada, por ejemplo, incrementada o disminuida, la susceptibilidad a inhibidores de proteasas, tal como tipranavir ("TPV"), en un sujeto infectado con VIH usando información genotípica del VIH.

2. Antecedentes de la invención

10 Más de 60 millones de personas han sido infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"), el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), desde el principio de los 80. Véase Lucas, 2002, *Lep Rev.* 73(1): 64-71. El VIH/SIDA es actualmente la causa principal de muerte en el África sub-Sahariana y es la cuarta causa de muerte en todo el mundo. Al final de 2001, aproximadamente 40 millones de personas estaban viviendo con VIH globalmente. Véase Norris, 2002, *Radiol Technol.* 73(4): 339-363.

15 El objetivo del tratamiento con terapia de fármacos antiretrovirales es retrasar la progresión de la enfermedad y prolongar la supervivencia consiguiendo una supresión sostenida de la replicación viral. Los fármacos anti-VIH actuales tienen como diana diferentes estadios del ciclo de vida del VIH y una variedad de enzimas esenciales para la replicación y/o supervivencia del VIH. Por ejemplo, determinados fármacos aprobados para la terapia del SIDA inhiben la replicación del VIH interfiriendo con las actividades enzimáticas de proteasa ("PR") o transcriptasa inversa ("RT"). Entre los fármacos aprobados están inhibidores nucleosídicos de RT ("NRTI") tales como AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, abacavir, inhibidores nucleotídicos de RT tales como tenofovir, inhibidores no nucleosídicos de RT ("NNRTI") tales como nevirapina, efavirenz, delavirdina e inhibidores de proteasa ("PI") tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir y tipranavir.

20 Una consecuencia de la acción de un fármaco anti-viral es que puede ejercer una presión selectiva suficiente sobre la replicación del virus como para seleccionar mutantes resistentes al fármaco. Herrmann *et al.*, 1977, *Ann NY Acad Sci* 284: 632-637. Con una exposición creciente al fármaco, la presión selectiva sobre la población de virus que se replican se incrementa para estimular el surgimiento más rápido de mutantes resistentes al fármaco.

30 Con el surgimiento inevitable de resistencia a los fármacos, deben diseñarse estrategias para optimizar el tratamiento frente a las poblaciones de virus resistentes. El establecimiento de la contribución de la resistencia a fármacos al fracaso de los fármacos es difícil porque los pacientes que tienen probabilidad de desarrollar resistencia a fármacos también tienen probabilidad de tener otros factores que les predisponen a un mal pronóstico. Richman, 1994, *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 901-905. Además, cada paciente alberga típicamente una mezcla diversa de cepas mutantes del virus teniendo diferentes cepas mutantes diferentes susceptibilidades a los fármacos anti-virales.

35 Así, se requieren ensayos de susceptibilidad a fármacos antivirales para aislados clínicos de VIH para monitorizar el desarrollo de resistencia a fármacos durante la terapia. Idealmente, los ensayos que determinan la susceptibilidad a fármacos de aislados de VIH deben ser rápidos, reproducibles, no peligrosos, aplicables a todas las muestras y rentables. Actualmente, se usan dos estrategias generales para medir la resistencia a fármacos anti-virales. La primera estrategia, denominada ensayo fenotípico, mide la susceptibilidad del virus tomado de un virus de una persona infectada a fármacos anti-virales particulares en un sistema de ensayo *in vitro*. Véase, por ejemplo, Kellman y Larder, 1994, *Antimicrob. Agents and Chemother* 38: 23-30; Petropoulos *et al.*, 2000, *Antimicrob. Agents Chemother* 44: 920-928; Hertogs *et al.*, 1998, *Antimicrob. Agents Chemother* 42(2): 269-76. La segunda estrategia, ensayo genotípico, implica identificar la presencia de mutaciones en el ácido nucleico de VIH que confieren resistencia a determinados fármacos antivirales en un paciente infectado con ese virus.

45 El ensayo genotípico, en algunos aspectos, promete determinadas ventajas sobre el ensayo fenotípico ya que las instalaciones necesarias para el ensayo genotípico son generalmente más económicas y menos complejas que las del ensayo fenotípico y el genotipado es típicamente menos laborioso de realizar y se pueden tener los resultados en menos tiempo. Sin embargo, con el fin de deducir la sensibilidad viral de un genotipo dado, es necesario conocer los efectos en la resistencia a fármacos de mutaciones de resistencia particulares. Una complicación adicional de los ensayos genotípicos es que la interpretación manual de dichos ensayos es difícil porque una gran número de mutaciones de resistencia a fármacos interaccionan en patrones complejos.

50 El tipranavir es un inhibidor de proteasa no peptídico aprobado en 2005, que posee una actividad antiviral amplia frente a muchos VIH-1 resistentes a inhibidores de proteasa. Véase Larder *et al.*, 2000, *AIDS* 14: 1943-48. Sin embargo, ya se ha descrito bien la resistencia a este inhibidor de proteasa. Véase Doyon *et al.*, *Antiviral Res.* 2005, 68: 27-35 describe la

selección y caracterización *in vitro* de variantes de VIH-1 que tienen una susceptibilidad reducida a tipranavir. Se asociaron diez posiciones de aminoácidos en la proteasa de VIH-1 con una susceptibilidad reducida a tipranavir. Véase *id.* Un estudio posterior encontró veintiuna mutaciones diferentes en dieciséis posiciones en la proteasa de VIH-1 que se correlacionaban con susceptibilidad reducida a tipranavir o respuesta reducida a terapia con tipranavir. Véase
 5 Kohlbrenner *et al.*, presentación en la reunión titulada "Tipranavir Mutation Score Predicts ViroLogic Success in PI-Experienced HIV-Positive Adults", presentado en HIV DART Conference (diciembre 2004) ("el estudio Kohlbrenner *et al.*"). Se postuló un algoritmo crudo que intentó correlacionar la resistencia fenotípica a tipranavir con el número de mutaciones observadas en las dieciséis posiciones identificadas y, por lo tanto, intentó predecir la eficacia del
 10 tratamiento con tipranavir. Véase *id.* Según el algoritmo, un virus era susceptible a tratamiento con tipranavir si tenía cuatro o menos mutaciones en las dieciséis posiciones identificadas en su proteasa. Si el número de mutaciones en esas dieciséis posiciones era cuatro o más, se predijo que el virus era resistente al tratamiento con tipranavir. Véase *id.*

Hasta la fecha, los esfuerzos para usar correlatos genotípicos de susceptibilidad reducida para predecir la eficacia de tipranavir son, como mucho, imperfectos. Un algoritmo que pudiera predecir más exactamente si un fármaco o combinación de fármacos anti-virales dado sería eficaz para tratar a un paciente dado ahorraría tiempo y dinero
 15 identificando fármacos y combinaciones de fármacos que probablemente no tengan éxito antes de su administración al paciente. De forma más importante, mejoraría la calidad de vida del paciente al librarle a él o a ella del trauma del tratamiento con toxinas potentes que no resultan en ninguna mejoría respecto a su infección con VIH. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de un algoritmo más exacto para predecir si tipranavir sería eficaz para tratar a un paciente particular.

20 3. Resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos y composiciones para desarrollar y usar algoritmos para determinar la eficacia de una terapia o combinación de terapias anti-virales. Los algoritmos se basan en un análisis de datos fenotípicos y genotípicos emparejados guiado por cortes fenotípicos (el punto en el que empieza la resistencia a una
 25 terapia y termina la sensibilidad). Los algoritmos mejoran significativamente la calidad de vida de un paciente al predecir exactamente si un fármaco anti-viral dado sería eficaz en el tratamiento del paciente, al librarle a él o a ella de esta manera del trauma del tratamiento con toxinas potentes que no resultan en ninguna mejoría en su infección con VIH.

En un aspecto, la presente invención proporciona algoritmos que permiten proporcionar a un paciente un régimen de tratamiento eficaz mediante la predicción de si un individuo infectado responderá a tratamiento con un agente o combinación de agentes anti-virales, permitiendo de esta manera el diseño de un régimen de tratamiento eficaz sin
 30 someter al paciente a efectos secundarios innecesarios. También, al evitar la administración de fármacos ineficaces, se ahorra un tiempo y dinero considerables.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para determinar la susceptibilidad de un virus a un tratamiento anti-viral, que comprende detectar, en el genoma viral o enzimas virales, la presencia o ausencia de mutaciones asociadas con una susceptibilidad reducida al tratamiento anti-viral.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para determinar la eficacia de un tratamiento anti-viral de un individuo infectado con un virus, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de mutaciones en el genoma o proteínas virales asociadas con una susceptibilidad reducida al tratamiento anti-viral.

La presente invención también proporciona métodos para monitorizar la progresión clínica de una infección viral en individuos que reciben un tratamiento anti-viral determinando, como se ha descrito anteriormente, la eficacia del mismo
 40 tratamiento anti-viral o uno diferente.

En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar si es probable que un VIH-1 presente susceptibilidad reducida al tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, que comprende: detectar, en un gen que codifica una proteasa del VIH-1, la presencia o ausencia de las mutaciones en la proteasa de VIH-1 listadas en la Tabla 3, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 3; y
 45 sumar los factores de ponderación para cada una de las mutaciones que se detectan para calcular una puntuación de mutación para el VIH-1. Es probable que dicho VIH-1 presente una susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es igual a o mayor que una puntuación de corte y es probable que el VIH-1 sea susceptible a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es menor que dicha puntuación de corte. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es parcialmente resistente a dicho tratamiento. En determinadas
 50 realizaciones, el VIH-1 es resistente a dicho tratamiento. En una realización, la puntuación de corte es 4. En otra realización, la puntuación de corte es 5. En otra realización, la puntuación de corte es 6. En otra realización, la puntuación de corte es 7.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si es probable que un VIH-1 que infecta a un individuo presente susceptibilidad reducida a tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, que

comprende: detectar, en una muestra del individuo, la presencia o ausencia de una o más de las mutaciones en la proteasa de VIH-1 listadas en la Tabla 3, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 3; y sumar dichos factores de ponderación que se detectan en la etapa (a) para calcular una puntuación de mutación para el VIH-1. Es probable que dicho VIH-1 presente una susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es igual a o mayor que una puntuación de corte y es probable que dicho VIH-1 sea susceptible a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es menor que dicha puntuación de corte. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es parcialmente resistente a dicho tratamiento. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es resistente a dicho tratamiento. En una realización, la puntuación de corte es 4. En otra realización, la puntuación de corte es 5. En otra realización, la puntuación de corte es 6. En otra realización, la puntuación de corte es 7.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si es probable que un VIH-1 presente susceptibilidad reducida a tratamiento con un inhibidor de proteasa; tal como tipranavir, que comprende: detectar, en un gen que codifica una proteasa del VIH-1, la presencia o ausencia de una o más de las mutaciones en la proteasa de VIH-1 listadas en la Tabla 9, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 9; y sumar los factores de ponderación para cada una de las mutaciones que se detectan para calcular una puntuación de mutación para el VIH-1. Es probable que dicho VIH-1 presente una susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es igual a o mayor que una puntuación de corte y es probable que el VIH-1 sea susceptible a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es menor que dicha puntuación de corte. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es parcialmente resistente a dicho tratamiento. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es resistente a dicho tratamiento. En una realización, la puntuación de corte es 4. En otra realización, la puntuación de corte es 5. En otra realización, la puntuación de corte es 6. En otra realización, la puntuación de corte es 7. En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si es probable que un VIH-1 que infecta a un individuo presente susceptibilidad reducida a tratamiento con un inhibidor de proteasa; tal como tipranavir, que comprende: detectar, en una muestra del individuo, la presencia o ausencia de una o más de las mutaciones en la proteasa de VIH-1 listadas en la Tabla 9, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 9; y sumar dichos factores de ponderación que se detectan en la etapa (a) para calcular una puntuación de mutación para el VIH-1. Es probable que dicho VIH-1 presente una susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es igual a o mayor que una puntuación de corte y es probable que dicho VIH-1 sea susceptible a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa si dicha puntuación total es menor que dicha puntuación de corte. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es parcialmente resistente a dicho tratamiento. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es resistente a dicho tratamiento. En una realización, la puntuación de corte es 4. En otra realización, la puntuación de corte es 5. En otra realización, la puntuación de corte es 6. En otra realización, la puntuación de corte es 7.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener susceptibilidad reducida a 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 susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 11, 32, 36, 46, 55, 60, 71, 73, 84, 89 y/o 90 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, en el que la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida a tratamiento con el inhibidor de proteasa. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es parcialmente resistente a dicho tratamiento. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es resistente a dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa es tipranavir. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a un inhibidor de proteasa puede detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen más adelante.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10I, V11L, V32I, M46I, K55R, D60E, A71L, G73T, I84V, L89V y L90M.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un individuo infectado con VIH tiene una probabilidad incrementada de tener susceptibilidad reducida a tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 11, 32, 36, 46, 55, 60, 71, 73, 84, 89 y/o 90 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, en el que la presencia de dicha mutación indica que el individuo tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida a tratamiento con el inhibidor de proteasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa es tipranavir. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a un inhibidor de proteasa puede detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen más adelante.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10I, V11L, V32I, M46I, K55R, D60E, A71L, G73T, I84V, L89V y L90M.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener susceptibilidad incrementada a 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 susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 24, 30, 50, 54, 76, 82 y/o 88 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, en el que la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad incrementada de tener susceptibilidad incrementada a tratamiento con el inhibidor de proteasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa es tipranavir. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a un inhibidor de proteasa puede detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen más adelante.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, L24I, D30N, I50L/V, I54L, L76V, V82I y N88D.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH-1 que infecta a un individuo tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad incrementada a tratamiento con un inhibidor de proteasa, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 24, 30, 50, 54, 76, 82 y/o 88 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, en el que la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad incrementada de tener susceptibilidad incrementada a tratamiento con el inhibidor de proteasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa es tipranavir. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a un inhibidor de proteasa puede detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen más adelante.

25 En algunas realizaciones, la mutación asociada con susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, L24I, D30N, I50L/V, I54L, L76V, V82I y N88D.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar si es probable que un VIH-1 sea resistente a un inhibidor de proteasa, que comprende introducir en un medio legible por ordenador datos genotípicos de una proteasa de VIH-1 del VIH-1; comparar los datos genotípicos con una base de datos que comprende un conjunto de mutaciones, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 3; y calcular una puntuación de mutación sumando los factores de ponderación asociados con la o las mutaciones presentes en el genotipo del VIH-1, en el que si la puntuación de mutación es igual a o mayor que una puntuación de corte, se determina que el VIH-1 presenta una susceptibilidad reducida a tipranavir. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es parcialmente resistente a tipranavir. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es resistente a tipranavir.

35 En determinadas realizaciones, el método implementado por ordenador comprende además visualizar si se determina que el VIH-1 es resistente o no a tipranavir. Por ejemplo, el resultado puede visualizarse en un medio tangible tal como papel u otra forma de impresión o en una pantalla de ordenador u otros medios tangibles sin limitación.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar si es probable que un VIH-1 sea resistente a un inhibidor de proteasa, que comprende introducir en un medio legible por ordenador datos genotípicos de una proteasa de VIH-1 del VIH-1; comparar los datos genotípicos con una base de datos que comprende un conjunto de mutaciones, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 9; y calcular una puntuación de mutación sumando los factores de ponderación asociados con la o las mutaciones presentes en el genotipo del VIH-1, en el que si la puntuación de mutación es igual a o mayor que una puntuación de corte, se determina que el VIH-1 presenta una susceptibilidad reducida a tipranavir. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es parcialmente resistente a tipranavir. En determinadas realizaciones, el VIH-1 es resistente a tipranavir.

En determinadas realizaciones, el método implementado por ordenador comprende además visualizar si se determina que el VIH-1 es resistente o no a tipranavir. Por ejemplo, el resultado puede visualizarse en un medio tangible tal como papel u otra forma de impresión o en una pantalla de ordenador u otros medios tangibles sin limitación.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende instrucciones legibles por ordenador para llevar a cabo un método implementado por ordenador de la invención. Por ejemplo, el artículo de fabricación puede ser un disquete, CD, DVD, cinta magnética, y así sucesivamente, sin limitación.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema de ordenador que se configura para llevar a cabo un método implementado por ordenador de la invención.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un medio legible por ordenador que comprende un programa de ordenador que determina si un VIH-1 que infecta a un sujeto es resistente a un inhibidor de proteasa, tal como, por ejemplo, tipranavir, que comprende un código de ordenador que recibe entradas correspondientes a un genotipo de un ácido nucleico de VIH-1 que codifica una proteasa de VIH-1 obtenido del VIH-1 que infecta al sujeto; un código de ordenador que llevar a cabo una comparación para determinar si están presentes las mutaciones listadas en la Tabla 3; un código de ordenador que calcula una puntuación de mutación basada el número de mutaciones presentes; un código de ordenador que determina si la puntuación de mutación es igual a o mayor que una puntuación de corte, en el que se determina que el VIH-1 es resistente a tipranavir si la puntuación de mutación es igual a o mayor que la puntuación de corte; y un código de ordenador que transmite un resultado que representa si se determina que el VIH-1 tiene o no una susceptibilidad reducida a tipranavir a un dispositivo de salida.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un medio legible por ordenador que comprende un programa de ordenador que determina si un VIH-1 que infecta a un sujeto es resistente a un inhibidor de proteasa, tal como, por ejemplo, tipranavir, que comprende un código de ordenador que recibe entradas correspondientes a un genotipo de un ácido nucleico de VIH-1 que codifica una proteasa de VIH-1 obtenido del VIH-1 que infecta al sujeto; un código de ordenador que lleva a cabo una comparación para determinar si están presentes las mutaciones listadas en la Tabla 9; un código de ordenador que calcula una puntuación de mutación basada en el número de mutaciones presentes; un código de ordenador que determina si la puntuación de mutación es igual a o mayor que una puntuación de corte, en el que se determina que el VIH-1 es resistente a tipranavir si la puntuación de mutación es igual a o mayor que la puntuación de corte; y un código de ordenador que transmite un resultado que representa si se determina que el VIH-1 tiene o no una susceptibilidad reducida a un dispositivo de salida.

En determinadas realizaciones, el dispositivo de salida es una impresora. En determinadas realizaciones, el dispositivo de salida es un sistema de visualización del ordenador, por ejemplo, un panel de visualización plano o un monitor CRT.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un medio tangible que comprende el resultado transmitido al dispositivo de salida por el producto de programa de ordenador descrito anteriormente. En determinadas realizaciones, el medio tangible es una impresión. En otras realizaciones, el medio tangible es un CD o DVD.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un medio legible por ordenador que comprende datos que indican si un VIH-1 es resistente a un inhibidor de proteasa, tal como, por ejemplo, tipranavir, e instrucciones legibles por ordenador para llevar a cabo un método de la invención como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el medio tangible es un disquete, CD, DVD, cinta magnética, unidad de disco fijo, iPod™ y semejantes.

4. Descripción breve de las figuras

La FIG. 1 es una representación esquemática de mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir identificadas en el estudio Kohlbrenner *et al.*

35 La FIG. 2 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad a tipranavir (Log de la tasa de cambio para tipranavir) de muestras obtenidas de un conjunto de datos con 1.411 muestras de pacientes como una función del número de las mutaciones en la proteasa asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir. La puntuación de corte genotípica es 5, es decir, se define que un VIH-1 tiene un genotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si su puntuación total es 5 o mayor y un genotipo sensible si su puntuación total es menor de 5. La puntuación de corte fenotípica es 4, es decir, se define que un VIH-1 tiene un fenotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si una tasa de cambio para CI_{50} es mayor de 4 para tipranavir y un fenotipo sensible si su puntuación total es menor de 4.

45 La FIG. 3 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad a tipranavir (Log de la tasa de cambio para tipranavir) de muestras obtenidas de un conjunto de datos con 1.411 muestras de pacientes como una función del número de las mutaciones en la proteasa asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir. La puntuación de corte genotípica es 4, es decir, se define que un VIH-1 tiene un genotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si su puntuación total es 4 o mayor y un genotipo sensible si su puntuación total es menor de 4. La puntuación de corte fenotípica es 2, es decir, se define que un VIH-1 tiene un fenotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si una tasa de cambio para CI_{50} es mayor de 2 para tipranavir y un fenotipo sensible si su puntuación total es menor de 2.

50 La FIG. 4 es un gráfico de dispersión que muestra una proporción de susceptibilidad a tipranavir (tasa de cambio) de muestras obtenidas de un conjunto de datos de 1.411 muestras de pacientes respecto a la tasa de cambio mediana de muestras con la misma puntuación de mutación para tipranavir, como una función del número de las mutaciones asociadas con resistencia en la proteasa. Se calcularon la tasa de cambio mediana para CI_{50} para tipranavir para

muestras en cada categoría definida por la puntuación de mutación. Las muestras se agruparon tomando como base la tasa de cambio para tipranavir medida siendo mayores ("H") o menores ("L") que la mediana para cada grupo.

La FIG. 5 muestra que la correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo del estudio Kohlbrenner *et al.* tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,51.

5 La FIG. 6 es un gráfico de dispersión que muestra que la correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo del estudio Kohlbrenner *et al.* tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,51.

La FIG. 7 muestra que la correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo de la presente invención tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,66.

10 La FIG. 8 es un gráfico de dispersión que muestra que la correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo de la presente invención tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,66.

15 La FIG. 9 es un gráfico de dispersión que muestra la aplicación del algoritmo antiguo en un conjunto de datos nuevo con 1.845 muestras de pacientes. La puntuación de corte genotípica es 4, es decir, se define que un VIH-1 tiene un genotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si su puntuación total es 4 o mayor y un genotipo sensible si su puntuación total es menor de 4. La puntuación de corte fenotípica es 2, es decir, se define que un VIH-1 tiene un fenotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si una tasa de cambio para CI_{50} es mayor de 2 para tipranavir y un fenotipo sensible si su puntuación total es menor de 2.

20 La FIG. 10 es un gráfico de dispersión que muestra la aplicación del algoritmo nuevo en un conjunto de datos nuevo con 1.845 muestras de pacientes. La puntuación de corte genotípica es 4, es decir, se define que un VIH-1 tiene un genotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si su puntuación total es 4 o mayor y un genotipo sensible si su puntuación total es menor de 4. La puntuación de corte fenotípica es 2, es decir, se define que un VIH-1 tiene un fenotipo con susceptibilidad reducida a tipranavir si una tasa de cambio para CI_{50} es mayor de 2 para tipranavir y un fenotipo sensible si su puntuación total es menor de 2.

25 La FIG. 11 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad a tipranavir (Log de la tasa de cambio para tipranavir) de muestras obtenidas de un conjunto de datos con 4.492 muestras de pacientes como una función de la puntuación de mutación de la muestra calculada con el algoritmo antiguo.

Las FIGS. 12A-C presentan un árbol de regresión que muestra la capacidad predictiva de mutaciones particulares para resistencia o susceptibilidad a TPV.

30 Las FIGS. 13A-B presentan un árbol de clasificación que muestra la capacidad predictiva de mutaciones particulares para resistencia o susceptibilidad a TPV.

La FIG. 14 es un gráfico de dispersión que muestra la susceptibilidad a tipranavir (Log de la tasa de cambio para tipranavir) de muestras obtenidas de un conjunto de datos con 3.880 muestras de pacientes como una función de la puntuación de mutación de la muestra calculada con el algoritmo ajustado.

35 La FIG. 15 ilustra un sistema de ordenador según una realización de la presente invención.

5. Descripción detallada de la invención

40 La presente invención proporciona métodos y dispositivos para identificar poblaciones de VIH-1 que tienen una susceptibilidad alterada a un inhibidor de proteasa ("PI"). En determinados aspectos, los métodos comprenden el uso de un algoritmo de interpretación del genotipo. La presente invención también proporciona métodos para determinar la susceptibilidad de un virus a un tratamiento anti-viral, métodos para determinar la eficacia de un tratamiento anti-viral de un individuo infectado con un virus y métodos para monitorizar la progresión clínica de una infección viral en individuos que reciben tratamiento anti-viral.

45 Los algoritmos utilizados en los métodos de la invención se han desarrollado por análisis y evaluación de los genotipos de un gran conjunto de datos de VIH-1 con fenotipos conocidos para determinar los conjuntos de mutaciones de proteasa y combinaciones de estas mutaciones que confieren una susceptibilidad alterada a inhibidores de proteasa. Lo siguiente describe generalmente métodos para generar algoritmos de interpretación de genotipo para el propósito de identificar virus resistentes a fármacos.

5.1 Abreviaturas

"VIH" es una abreviatura para virus de inmunodeficiencia humana. "PR" es una abreviatura para proteasa. "PI" es una abreviatura para inhibidor de proteasa. "PCR" es una abreviatura para reacción en cadena de la polimerasa. "TPV" es una abreviatura para tipranavir. "FC" es una abreviatura para la tasa de cambio. "GT-R o Gr", "GT-S o Gs", "PT-R o Pr" y "PT-S o Ps" son abreviaturas para genotípicamente resistente o parcialmente resistente, genotípicamente susceptible, fenotípicamente tiene una susceptibilidad reducida y fenotípicamente susceptible, respectivamente.

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

Aminoácido	Abreviatura de una Letra	Abreviatura de Tres 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
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

10 A no ser que se indique otra cosa, cuando las secuencias polipeptídicas se presentan como una serie de abreviaturas de una letra y/o tres letras, las secuencias se presentan en la dirección N-terminal a C-terminal, según la práctica común.

15 Los aminoácidos sustituidos o mutantes en las posiciones de la proteasa de VIH-1 se representan en la presente memoria en una forma abreviada tal como "M184I/L/V", en el que "M" es una representación de una letra del aminoácido de referencia no mutante metionina en la posición "184" de la proteasa de VIH-1 e "I", "L" y "V" representan las representaciones de una letra de los posibles aminoácidos mutantes que pueden estar sustituidos por M en la posición 36 en la proteasa.

5.2 Definiciones

- Tal y como se usa en la presente memoria, "datos genotípicos" son datos acerca del genotipo, por ejemplo, de un virus. Los ejemplos de datos genotípicos incluyen, pero no están limitados a, la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de un virus, una parte de un virus, un gen viral, una parte de un gen viral, o la identidad de uno o más residuos de nucleótidos o aminoácidos en un ácido nucleico o proteína viral.
- Un "ensayo genotípico" es un ensayo que determina una secuencia genética de un organismo, una parte de un organismo, un gen o una parte de un gen. Dichos ensayos se realizan frecuentemente en VIH para establecer si están presentes determinadas mutaciones asociadas con resistencia a fármacos.
- Un "ensayo fenotípico" es un ensayo que mide la sensibilidad de un virus (tal como VIH) a un agente anti-viral específico.
- "Susceptibilidad" se refiere a la respuesta de un virus a un fármaco particular. Un virus que es menos susceptible o que tiene una susceptibilidad disminuida a un fármaco es menos sensible o más resistente al fármaco. Un virus que tiene una susceptibilidad incrementada o aumentada o mayor a un fármaco tiene una sensibilidad incrementada o resistencia disminuida al fármaco.
- La susceptibilidad fenotípica a un fármaco se mide como la concentración del fármaco que se requiere para inhibir la replicación del virus un 50% (CI_{50}). Tal y como se usa en la presente memoria, una "tasa de cambio" o "FC" es la proporción de la CI_{50} de una variante viral dividida por la CI_{50} de un VIH de referencia. Una FC de 1,0 indica que la variante viral presenta el mismo grado de susceptibilidad al fármaco que el virus de referencia.
- Para fármacos para los que se han recogido suficientes datos de resultados clínicos, es posible definir un valor umbral o de corte clínico. Un valor umbral o de corte clínico define el punto por encima del cual la utilidad de un fármaco dado empieza a declinar tomando como base los datos de respuesta virológicos de ensayos clínicos. Representa un punto de resistencia creciente y sensibilidad decreciente del VIH a un fármaco particular. El valor de corte es diferente para agentes anti-virales diferentes. Los valores de corte clínicos se determinan en ensayos clínicos evaluando los datos de resistencia y resultados. La susceptibilidad a fármacos se mide en el inicio del tratamiento. La respuesta al tratamiento, tal como cambio en la carga viral, se monitoriza en puntos de tiempo predeterminados a lo largo del curso del tratamiento. La susceptibilidad a fármacos se correlaciona con la respuesta al tratamiento y el valor de corte clínico se determina por niveles de resistencia asociados con el fracaso del tratamiento (análisis estadístico de los resultados globales del ensayo).
- " CI_n " se refiere a la Concentración Inhibidora. Es la concentración del fármaco en la sangre del paciente o *in vitro* que se necesita para suprimir la reproducción de un microorganismo causante de una enfermedad (tal como VIH) un n%. Así, " CI_{50} " se refiere a la concentración de un agente anti-viral a la que la replicación del virus se inhibe un 50% del nivel observado en ausencia del fármaco. La " CI_{50} de un paciente" se refiere a la concentración de fármaco requerida para inhibir la replicación del virus de un paciente un 50% y " CI_{50} de referencia" se refiere a la concentración de fármaco requerida para inhibir la replicación de un virus de referencia o de tipo salvaje un 50%. De manera similar, " CI_{90} " se refiere a la concentración de un agente anti-viral a la que se inhibe el 90% de la replicación del virus.
- Una "tasa de cambio" es una comparación numérica de la susceptibilidad a un fármaco del virus de un paciente y un virus de referencia sensible al fármaco. Es la proporción de la CI_{50} del Paciente respecto a la CI_{50} de referencia sensible a fármaco, es decir, la CI_{50} del Paciente/ CI_{50} de Referencia= Tasa de Cambio ("FC"), Una tasa de cambio de 1,0 indica que el virus del paciente presenta el mismo grado de susceptibilidad al fármaco que el virus de referencia sensible al fármaco. Una tasa de cambio menor de 1 indica que el virus del paciente es más sensible que el virus de referencia sensible al fármaco. Una tasa de cambio mayor de 1 indica que el virus del paciente es menos susceptible que el virus de referencia sensible al fármaco. Una tasa de cambio igual a o mayor que el valor de corte clínico significa que el virus del paciente tiene una probabilidad menor de respuesta a ese fármaco. Una tasa de cambio menor que el valor de corte clínico significa que el virus del paciente es sensible a ese fármaco.
- "Tasa de cambio para tipranavir" se refiere a la proporción de la CI_{50} de tipranavir frente al VIH de la muestra de plasma del paciente respecto a la CI_{50} para tipranavir frente a la cepa viral de referencia NL4-3 (No. de Registro GenBank AF324496).
- Un virus es "sensible" a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir menor que el "corte clínico inferior". En algunas realizaciones, un virus es sensible a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir menor de 4. En algunas realizaciones, un virus es sensible a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir menor de 2.
- Un virus es "resistente" a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir mayor que el "corte clínico superior". En algunas realizaciones, un virus es resistente a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir mayor de 10. En algunas realizaciones, un virus es resistente a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir mayor de 15.

Un virus es "parcialmente resistente" a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir mayor que el "corte clínico inferior" pero menor que el "corte clínico superior". En algunas realizaciones, un virus es parcialmente resistente a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir entre 2 y 10. En algunas realizaciones, un virus es parcialmente resistente a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir entre 4 y 10. En algunas realizaciones, un virus es parcialmente resistente a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir entre 2 y 15. En algunas realizaciones, un virus es parcialmente resistente a tipranavir si tiene una tasa de cambio para tipranavir entre 4 y 15.

El término "mutación" se refiere a cualquier cambio en la secuencia de ácido nucleico de un VIH dado, o en la secuencia polipeptídica de las proteínas de un VIH dado, comparado con un VIH de referencia.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente a lo largo del documento.

Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente a lo largo del documento.

El término "concordancia" tal y como se usa en la presente memoria, significa que un genotipo de una muestra de VIH clasificado como GT-R o GT-S según un algoritmo concuerda con el fenotipo (PT-R o PT-S) de esa muestra de VIH.

El término "discordancia" tal y como se usa en la presente memoria, significa que un genotipo de una muestra de VIH clasificado como GT-R o GT-S según un algoritmo no concuerda con el fenotipo de esa muestra de VIH. Las muestras de discordancia incluyen identificaciones tanto de falsos negativos (GT-S, PT-R) como falsos positivos (GT-R, PT-S).

Los métodos y dispositivos de la presente invención surgen, en parte, de la creación de un algoritmo que predice la susceptibilidad alterada de VIH a tipranavir tomando como base un genotipo de VIH. Los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria incrementan significativamente la disponibilidad de información para los profesionales sanitarios y personas infectadas con VIH para realizar elecciones informadas respecto a la terapia con el fármaco tipranavir.

5.3 Determinación de la susceptibilidad al tratamiento anti-viral

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la susceptibilidad de un virus a tratamiento anti-viral. Las mutaciones asociadas con la susceptibilidad alterada a fármacos pueden identificarse y correlacionarse con la susceptibilidad alterada de un virus a un tratamiento anti-viral como se describe en las Secciones 5.4-5.5 más adelante. La presencia de dicha mutación en un virus puede detectarse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, como se discute en la Sección 5.4 más adelante. La presencia de una mutación asociada con susceptibilidad alterada a fármacos en el virus puede indicar que el virus tiene una probabilidad incrementada de tener bien una susceptibilidad reducida o una incrementada para el tratamiento anti-viral. En una realización, el virus es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En otra realización, el virus es el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). En otra realización, el tratamiento anti-viral es un inhibidor de proteasa. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen, pero no están limitados a, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir y tipranavir. En una realización, el inhibidor de proteasa es tipranavir.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida a tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, 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 susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 11, 32, 36, 46, 55, 60, 71, 73, 84, 89 y/o 90 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, en el que la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida a tratamiento con el inhibidor de proteasa. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a un inhibidor de proteasa puede detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen más adelante.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con una susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L1I, V11L, V32I, M46I, K55R, D60E, A71L, G73T, I84V, L89V y L90M.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH-1 que infecta a un individuo tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida a tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 11, 32, 36, 46, 55, 60, 71, 73, 84, 89 y/o 90 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, en el que la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida a tratamiento con el inhibidor de proteasa. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a un inhibidor de proteasa pueden detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con una susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10I, V11L, V32I, M46I, K55R, D60E, A71L, G73T, I84V, L89V y L90M.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad incrementada a tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, 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 susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 24, 30, 50, 54, 76, 82 y/o 88 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa, en el que la presencia de dicha mutación indica que el VIH tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad incrementada a tratamiento con el inhibidor de proteasa. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a un inhibidor de proteasa puede detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen más adelante.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con una susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, L24I, D30N, I50L/V, I54L, L76V, V82I y N88D.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH-1 que infecta a un individuo tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad incrementada a tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, que comprende detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de una mutación asociada con susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa en la posición de aminoácido 10, 24, 30, 50, 54, 76, 82 ó 88 de la secuencia de aminoácidos de la proteasa del VIH, en el que la presencia de dicha mutación indica que el VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad incrementada a tratamiento con el inhibidor de proteasa. La presencia de las mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a un inhibidor de proteasa puede detectarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. Los métodos para detectar dichas mutaciones se describen más adelante.

20 En algunas realizaciones, la mutación asociada con una susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, L24I, D30N, I50L/V, I54L, L76V, V82I y N88D.

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

La presencia o ausencia de una mutación viral según la presente invención puede detectarse por cualquier medio conocido en la técnica para detectar una mutación. Típicamente, las mutaciones de interés son aquellas identificadas para conferir resistencia a un fármaco antiviral particular o combinación de fármacos, bien existiendo sola o en una combinación con otras mutaciones. Así, la mutación puede detectarse en el gen viral que codifica una proteína particular, o en la proteína en sí misma, es decir, en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

30 En una realización, la mutación está en el ácido nucleico viral. Dicha mutación puede estar, por ejemplo, en un gen que codifica una proteína viral, en una secuencia reguladora que actúa en *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 entorno del virus que cambia su susceptibilidad a un tratamiento anti-viral. En una realización, la mutación está en un gen que codifica una proteína viral que es la diana de un tratamiento anti-viral.

35 En otra realización, la mutación está en un ácido nucleico de VIH-1 que codifica una proteasa. Por ejemplo, la mutación puede ser cualquier mutación en el codón 10, 11, 13, 20, 24, 30, 32, 33, 35, 36, 43, 46, 47, 50, 54, 58, 69, 71, 73, 74, 76, 82, 83, 84, 89 ó 90. En una realización, la mutación en el ácido nucleico que codifica la proteasa de VIH-1 se selecciona del grupo que consiste en L10I/V, I13V, K20M/V/R, L24I, D30N, V32I, L33F, E35G, M36I, K43T, M46I/L, I47V, I50L/V, I54A/L/M/V, Q58E, H69K, A71L, G73T, T74P, L76V, V82I/L/T, N83D, I84V, L89V y L90M.

40 En determinadas realizaciones, la mutación en un ácido nucleico de VIH-1 que codifica la proteasa de VIH-1 se correlaciona con una susceptibilidad reducida a tipranavir como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones, la mutación se correlaciona con resistencia parcial a tipranavir. En determinadas realizaciones, la mutación se correlaciona con resistencia a tipranavir. En determinadas realizaciones, la mutación en un ácido nucleico de VIH-1 que codifica una proteasa de VIH-1 se correlaciona con susceptibilidad incrementada a tipranavir como se describe en la presente memoria.

45 Una mutación en un gen viral puede detectarse utilizando cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación. El ADN o ARN viral puede usarse como el punto de partida para dichas técnicas de ensayo y puede aislarse según procedimientos estándar que son muy conocidos para los expertos en la técnica.

La detección de una mutación en secuencias de ácido nucleico específicas, tal como en una región particular de un gen viral, puede conseguirse por una variedad de métodos incluyendo, pero no limitado a, detección de polimorfismo de

longitud de fragmento de restricción basado en escisión por endonucleasa de restricción específica de alelo (Kan y Dozy, 1978, *Lancet* ii: 910-912), detección de reparación con emparejamiento erróneo (Faham y Cox, 1995, *Genome Res* 5: 474-482), unión de proteína MutS (Wagner *et al.*, 1995, *Nucl Acids Res* 23: 3944-3948), electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (Fisher *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1579-83), detección de polimorfismo de conformación monocatenaria (Orita *et al.*, 1983, *Genomics*, 5: 874-879), escisión con ARNasa en pares de bases emparejadas erróneamente (Myers *et al.*, 1985, *Science* 230: 1242), escisión química (Cotton *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 4397-4401) o enzimática (Youil *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 87-91) de ADN heterodúplex, métodos basados en la extensión con cebador específico de oligonucleótido (Syvänen *et al.*, 1990, *Genomics* 8: 684-692), análisis de bit genético (Nikiforov *et al.*, 1994, *Nucl Acids Res* 22: 4167-4175), ensayo de ligación de oligonucleótido (Landegren *et al.*, 1988, *Science* 241: 1077), reacción en cadena de ligación específica de oligonucleótido ("LCR") (Barrany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 189-193), LCR-gap (Abravaya *et al.*, 1995, *Nucl Acids Res* 23: 675-682), secuenciación de ADN radiactivo o fluorescente usando procedimientos estándar muy conocidos en la técnica y ensayos con ácido nucleico peptídico (PNA) (Orum *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 21: 5332-5356; Thiede *et al.*, 1996, *Nucl. Acids Res.* 24: 983-984).

Además, el ADN o ARN viral puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación para detectar anomalías que implican la estructura génica, incluyendo mutaciones, inserciones, deleciones puntuales y reorganizaciones genómicas. Dichos ensayos pueden incluir, pero no están limitados a, análisis Southern (Southern, 1975, *J. Mol. Biol.* 98: 503-517), análisis de polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP) (Orita *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 2766-2770) y análisis por PCR (Patentes U.S. Nos. 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; y 4.965.188; *PCR Strategies*, 1995, Innis *et al.* (eds.), Academic Press, Inc.).

Dichos métodos de diagnóstico para la detección de una mutación específica de gen pueden implicar, por ejemplo, poner en contacto e incubar los ácidos nucleicos virales con uno o más reactivos de ácido nucleico marcados incluyendo moléculas de ADN recombinante, genes clonados o muestras degeneradas de éstos, en condiciones favorables para la hibridación específica de estos reactivos a sus secuencias complementarias. Preferiblemente, las longitudes de estos reactivos de ácido nucleico son al menos 15 a 30 nucleótidos. Después de la incubación, todos los ácidos nucleicos no hibridados se eliminan de la molécula híbrida de ácido nucleico. Entonces se detecta la presencia de ácidos nucleicos que han hibridado, si dichas moléculas existen. Usando dicho esquema de detección, el ácido nucleico del virus puede inmovilizarse, por ejemplo, en un soporte sólido tal como una membrana, o una superficie de plástico tal como en una placa de microtitulación o lechos de poliestireno. En este caso, después de la incubación, los reactivos de ácido nucleico marcados no hibridados del tipo descrito anteriormente se eliminan fácilmente. La detección de los reactivos de ácido nucleico marcados restantes hibridados se consigue usando técnicas estándar muy conocidas para los expertos en la técnica. Las secuencias génicas con las que han hibridado los reactivos de ácido nucleico pueden compararse con el patrón de hibridación esperado de una secuencia génica normal con el fin de determinar si está presente una mutación génica.

Los métodos de diagnóstico alternativos para la detección de moléculas de ácido nucleico específicas de gen pueden implicar su amplificación, por ejemplo, por PCR (Patentes U.S. Nos. 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; y 4.965.188; *PCR Strategies*, 1995 Innis *et al.* (eds.), Academic Press, Inc.), seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica. Las secuencias amplificadas resultantes pueden compararse con aquellas que se esperarían si el ácido nucleico que se está amplificando contuviera sólo copias normales del gen respectivo con el fin de determinar si existe una mutación génica.

Además, el ácido nucleico puede secuenciarse por cualquier método de secuenciación conocido en la técnica. Por ejemplo, el ADN viral puede secuenciarse por el método dideoxi de Sanger *et al.*, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463, como describe adicionalmente Messing *et al.*, 1981, *Nuc. Acids Res.* 9: 309 o por el método de Maxam *et al.*, 1980, *Methods in Enzymology* 65: 499. Véanse también las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª ed., NY; y Ausubel *et al.*, 1988 y actualizaciones, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY.

Los métodos de la presente invención son aplicables para determinar la resistencia de una variante viral individual o para determinar la resistencia de una población variante, que puede genotiparse simultáneamente. Por ejemplo, para una secuencia dada, tal como PR, la secuenciación de una población variante conjuntamente proporciona un genotipo que puede usarse para la identificación de mutaciones PR pertinentes.

En la pasada década, se han desarrollado varias tecnologías que han hecho posible identificar grandes números (por ejemplo, cientos a cientos de miles) de secuencias de ácido nucleico en una muestra simultáneamente. Véase, por ejemplo, Kozal *et al.*, 1996, *Nat. Med.* 2(7): 753-759; Lockhart *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 1675-1680; Blanchard *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14, 1649; Patente U.S. No. 5.571.639 presentada el 5 de noviembre, 1996. Por ejemplo, un conjunto de sondas de oligonucleótidos de secuencias predeterminadas complementarias a varios genotipos de una proteasa de VIH puede unirse a localizaciones específicas en una fase sólida (una matriz) y se

determina la presencia o ausencia de las diferentes secuencias en una secuencia de ácido nucleico de VIH desconocida por los patrones de hibridación del ácido nucleico de VIH desconocido a las sondas en la fase sólida. Típicamente, se usan técnicas asistidas por ordenador para asistir en la recogida, procesamiento y evaluación de la gran cantidad de información obtenida con la utilización de la tecnología basada en matrices. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6.546.340 presentada el 8 de abril, 2003. Las matrices de sondas incluyendo las realizadas con especificaciones personalizadas, junto con los reactivos y software de análisis informatizado están todos disponibles comercialmente (por ejemplo, Affymetrix, Inc., Santa Clara CA).

La identificación de una mutación en una proteasa de VIH-1 puede determinarse por análisis de aminoácidos de la proteasa. La identificación de una mutación en una proteasa de VIH puede determinarse, por ejemplo, por el uso de anticuerpos que reconocen específicamente residuos de aminoácidos particulares en determinadas posiciones en la proteasa de VIH. Dichos anticuerpos pueden usarse en ensayos ELISA o estudios de inmunoprecipitación para evaluar la presencia de aminoácidos mutantes en la proteasa. Alternativamente, la proteasa de VIH puede secuenciarse directamente usando técnicas convencionales en la técnica. Por ejemplo, la proteasa puede digerirse con diferentes peptidasas y determinarse las composiciones de aminoácidos de los digeridos peptídicos usando espectrometría de masas. Las secuencias peptídicas resultantes pueden ensamblarse en la secuencia de la proteasa completa de VIH.

5.5 Medición de la susceptibilidad fenotípica de un virus mutante

Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para determinar la susceptibilidad fenotípica de un virus o población de virus mutante a una terapia anti-viral. En algunas realizaciones, se realiza un análisis fenotípico, es decir, la susceptibilidad del virus a un agente anti-viral dado puede ensayarse respecto a la susceptibilidad de un virus de referencia sin las mutaciones. Ésta es una medida directa, cuantitativa de la susceptibilidad al fármaco y puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica para determinar la susceptibilidad de un virus a un agente anti-viral. Un ejemplo de un método incluye, pero no está limitado a, determinar la tasa de cambio en los valores de CI_{50} respecto a un virus de referencia. El ensayo fenotípico mide la capacidad de una cepa viral específica para crecer in vitro en presencia de un fármaco inhibidor. Un virus es menos susceptible a un fármaco particular cuando se requiere más fármaco para inhibir la actividad viral, frente a la cantidad de fármaco requerida para inhibir el virus de referencia.

En una realización, el análisis fenotípico se realiza y se usa para calcular la CI_{50} o CI_{90} de un fármaco para una cepa viral. Los resultados del análisis también pueden presentarse como tasa de cambio en la CI_{50} o CI_{90} para cada cepa viral comparado con una cepa control susceptible al fármaco o una cepa viral anterior del mismo paciente. Como el virus se expone directamente a cada una de las medicaciones anti-virales disponibles, los resultados pueden ligarse directamente a la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, si el virus del paciente muestra resistencia a un fármaco particular, ese fármaco se evita u omite del régimen de tratamiento del paciente, permitiendo al médico diseñar un plan de tratamiento que probablemente sea más eficaz durante un periodo más largo de tiempo.

En otra realización, el análisis fenotípico se realiza usando ensayos de virus recombinantes ("RVA"). Los RVA usan preparaciones de virus generadas por recombinación homóloga entre vectores virales y secuencias génicas virales, amplificadas de los virus del paciente. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector VIH y las secuencias génicas virales pueden ser secuencias de proteasa y transcriptasa inversa.

En una realización, el análisis fenotípico se realiza usando PHENOSENSE™ (ViroLogic Inc., South San Francisco, CA). Véase Petropoulos *et al.*, 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 920-928; Patentes U.S. Nos. 5.837.464 y 6.242.187. PHENOSENSE™ es un ensayo fenotípico que consigue los beneficios del ensayo fenotípico y supera los inconvenientes de los ensayos previos. Como el ensayo se ha automatizado, PHENOSENSE™ ofrece un rendimiento mayor en condiciones controladas. El resultado es un ensayo que define exactamente el perfil de susceptibilidad de aislados de VIH de un paciente frente a todos los fármacos antiretrovirales disponibles actualmente y proporciona resultados directamente al médico en aproximadamente 10 a aproximadamente 15 días desde la recepción de la muestra. PHENOSENSE™ es exacto y puede obtener resultados con sólo una ronda de replicación viral, evitando de esta manera la selección de subpoblaciones de virus. Los resultados son cuantitativos, midiendo varios grados de susceptibilidad al fármaco y sensibles - el ensayo puede realizarse en muestras de sangre con una carga viral de aproximadamente 500 copias/mL y puede detectar poblaciones minoritarias de algunos virus resistentes al fármaco a concentraciones de 10% o menos de la población viral total. Además, los resultados son reproducibles y pueden variar menos de aproximadamente 1,4-2,5 veces, dependiendo del fármaco, en aproximadamente el 95% de los ensayos realizados.

PHENOSENSE™ puede usarse con ácidos nucleicos de secuencias génicas virales amplificadas. La muestra que contiene el virus puede ser una muestra de un ser humano o un animal infectado con el virus o una muestra de un cultivo de células virales. En una realización, la muestra viral comprende una cepa de laboratorio modificada genéticamente.

Puede construirse un vector de ensayo de resistencia ("RTV") incorporando las secuencias génicas virales amplificadas en un vector viral con replicación defectuosa usando cualquier método conocido en la técnica para incorporar secuencias

génicas en un vector. En una realización, se usan enzimas de restricción y métodos de clonación convencionales. Véase 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. En algunas realizaciones, se usan las enzimas de restricción *Apal* y *PinAl*. Preferiblemente, el vector viral con replicación defectuosa es el vector viral indicador génico ("IGVV"). En algunas realizaciones, el vector viral contiene un medio para detectar la replicación del RTV. Preferiblemente, el vector viral contiene un casete de expresión de luciferasa.

El ensayo puede realizarse co-transfectando en primer lugar células huésped con ADN de RTV y un plásmido que expresa las proteínas de la cubierta de otro retrovirus, por ejemplo, el virus de la leucemia murina antrópica (MLV). Después de la transfección, las partículas de virus pueden recogerse y usarse para infectar células diana frescas. La finalización de una única ronda de replicación viral puede detectarse por el medio para detectar la replicación contenido en el vector. En una realización, la finalización de una única ronda de replicación viral resulta en la producción de luciferasa. Pueden añadirse concentraciones seriadas de agentes anti-virales bien en la etapa de transfección o en la etapa de infección.

La susceptibilidad al agente anti-viral puede medirse comparando la replicación del vector en presencia y ausencia del agente anti-viral. Por ejemplo, la susceptibilidad al agente anti-viral puede medirse comparando la actividad luciferasa en presencia y ausencia del agente anti-viral. Los virus susceptibles producirán bajos niveles de actividad luciferasa en presencia de agentes anti-virales, mientras que los virus con susceptibilidad reducida producirán altos niveles de actividad luciferasa.

En una realización, PHENOSENSE™ se usa en la evaluación de la susceptibilidad fenotípica de VIH-1 a fármacos anti-virales. Preferiblemente, el fármaco anti-viral es un inhibidor de proteasa. Más preferiblemente, es tipranavir. En algunas realizaciones, la cepa viral de referencia es la cepa de VIH NL4-3 o HXB-2.

En una realización, el ácido nucleico viral, por ejemplo, ARN de VIH-1 puede extraerse de muestras plasmáticas, y un fragmento de, o los genes virales enteros podría amplificarse por métodos tales como, pero no limitados a PCR. Véase, 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 completa PR y RT de VIH-1 puede amplificarse por PCR anidada con transcripción inversa. El conjunto de ácido nucleico amplificado, por ejemplo, las secuencias codificadoras PR y RT, pueden cotransfectarse en una célula huésped tal como linfocitos T CD4+ (MT4) con el plásmido pGEMT3ΔPRT en el que están delecionadas la mayor parte de las secuencias PR (codones 10 a 99) y RT (codones 1 a 482). La recombinación homóloga da lugar a la generación de virus quiméricos que contienen secuencias codificadoras virales, tales como las secuencias codificadoras PR y RT derivadas de ARN de VIH-1 en plasma. Las susceptibilidades de los virus quiméricos a todos los agentes anti-virales disponibles actualmente dirigidos a los productos de los genes transfectados (inhibidores proRT y/o PR, por ejemplo), pueden determinarse por cualquier ensayo de viabilidad celular conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de viabilidad celular en células MTA basado en bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazolio en un sistema automatizado que permite un alto rendimiento de muestras. El perfil de resistencia a todos los agentes anti-virales, tal como los inhibidores RT y PR, puede visualizarse gráficamente en un único Antivirograma PR-RT.

Pueden usarse otros ensayos para evaluar la susceptibilidad fenotípica de un virus a fármacos anti-virales conocidos para un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Shi y Mellors, 1997, *Antimicrob Agentes Chemother.* 41(12): 2781-85; Gervaix *et al.*, 1997, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94(9): 4563-8.

En otra realización, la susceptibilidad de un virus a tratamiento con un tratamiento anti-viral se determina ensayando la actividad de la diana del tratamiento anti-viral en presencia del tratamiento anti-viral. En una realización, el virus es VIH, el tratamiento anti-viral es un inhibidor de proteasa y la diana del tratamiento anti-viral es la proteasa de VIH. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.436.131 y 6.103.462.

5.6 Correlación de la resistencia fenotípica y genotípica a inhibidores de proteasa

Pueden usarse conjuntos de datos de variantes virales con fenotipos identificados para correlacionar la resistencia fenotípica y genotípica a inhibidores de proteasa.

Puede realizarse un análisis fenotípico y usarse para calcular la CI_{50} o CI_{90} de un fármaco para una variante viral. Los resultados del análisis también pueden presentarse como tasa de cambio en la CI_{50} o CI_{90} para cada variante comparado con un virus de referencia susceptible al fármaco o una muestra viral tomada del mismo sujeto antes de una terapia con fármaco.

Puede usarse cualquier método conocido en la técnica, sin limitación, para determinar la susceptibilidad o resistencia fenotípica de un virus o población de virus mutante a una terapia anti-viral. Los ejemplos para determinar fenotipos pueden encontrarse, por ejemplo en las Patentes U.S. Nos. 6.653.081, 6.489.098, 6.351.690, 6.242.187 y 5.837.464. Por

ejemplo, puede realizarse un ensayo fenotípico usando el ensayo de fenotipo de VIH PHENOSENSE™ (ViroLogic Inc., South San Francisco, CA), como se ha discutido anteriormente. Véase Petropoulos *et al.*, 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 920-928.

5 Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para determinar si una mutación se correlaciona con un incremento en la resistencia de un virus a un inhibidor de proteasa. Típicamente, se usan valores P para determinar la significancia estadística de la correlación, de manera que cuanto más pequeño es el valor de P, más significativa es la medida. Preferiblemente, los valores P serán menores de 0,05 (ó 5%). Más preferiblemente, los valores P serán menores de 0,01. Los valores P pueden calcularse por cualquier medio conocido para un experto en la técnica. Para los propósitos de correlacionar un incremento en resistencia de un VIH-1 con una mutación, los valores P pueden calcularse usando el Ensayo Exacto de Fisher. Véase, por ejemplo, David Freedman, Robert Pisani y Roger Purves, 1980, STATISTICS, W.W. Norton, Nueva York. Los valores P pueden calcularse usando el ensayo de la t de Student pareada y/o no pareada y el ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis (software Statview 5.0, SAS, Cary, NC).

15 Las mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a un fármaco en el gen de la proteasa de VIH-1 se clasifican generalmente en dos grupos. Un primer grupo incluye típicamente aquellas mutaciones bien seleccionadas en primer lugar en presencia del fármaco o que se muestra de otra manera que tienen un efecto en la unión del fármaco a la proteasa o un efecto en la actividad y replicación virales. Un segundo grupo de mutaciones puede incluir mutaciones que aparecen más tarde que las mutaciones primarias y que por sí mismas no tienen un efecto significativo en el fenotipo de resistencia. Se piensa que este segundo grupo de mutaciones mejoran frecuentemente la aptitud replicativa causada por mutaciones del primer grupo.

20 Las muestras biológicas pueden incluir cualquier muestra que puede contener un VIH, preferiblemente un VIH-1. Las muestras biológicas de un sujeto infectado con VIH incluyen, por ejemplo y sin limitación, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina, saliva, frotis de tejido y semejantes.

5.7 Construcción de un algoritmo

25 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para construir un algoritmo que correlaciona los datos genotípicos acerca de un virus con los datos fenotípicos acerca del virus. En una realización, los datos fenotípicos están relacionados con la susceptibilidad del virus a un tratamiento anti-viral. En algunas realizaciones, el tratamiento anti-viral es un compuesto anti-viral. En algunas realizaciones, el compuesto anti-viral es un inhibidor de proteasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa es tipranavir.

30 En una realización, el método para construir el algoritmo comprende crear una norma o normas que correlacionan los datos genotípicos acerca de un conjunto de virus con los datos fenotípicos acerca del conjunto de virus.

35 En una realización, se ensambla un conjunto de datos que comprende datos genotípicos y fenotípicos acerca de cada virus en un conjunto de virus. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para recoger datos genotípicos acerca de un virus. Los ejemplos de métodos para recoger dichos datos se han proporcionado anteriormente. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para recoger datos fenotípicos acerca de un virus. Los ejemplos de dichos métodos también se han proporcionado anteriormente. En algunas realizaciones, el conjunto de datos comprende uno o más RAM como se ha descrito anteriormente. En una realización, cada dato genotípico es la secuencia de toda o parte de una proteína viral de un virus en el conjunto de virus. En algunas realizaciones, cada dato genotípico en el conjunto de datos es un único cambio de aminoácidos en una proteína codificada por el virus, respecto a una proteína de referencia en el virus de referencia. En algunas realizaciones, el genotipo comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más cambios de aminoácidos en la proteína viral. En algunas realizaciones, el virus es VIH y la proteína es la proteasa de VIH. En una realización, el virus es VIH-1. En otra realización, la proteína de referencia es la proteasa de VIH NL4-3.

45 En una realización, cada dato fenotípico en el conjunto de datos es la susceptibilidad a un tratamiento anti-viral de un virus en el conjunto de virus. En una realización, el tratamiento anti-viral es con un compuesto anti-viral. En algunas realizaciones, el compuesto anti-viral es un inhibidor de proteasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteasa es tipranavir. En una realización, la susceptibilidad se mide como un cambio en la susceptibilidad del virus respecto a un virus de referencia. En otra realización, la susceptibilidad se mide como un cambio en la CI_{50} del virus respecto a un virus de referencia. En otra realización, el cambio en la CI_{50} se representa como la tasa de cambio en la CI_{50} . En una realización, el virus es VIH. En otra realización, el virus es VIH-1. En otra realización, el VIH de referencia es VIH NL4-3.

50 Los datos genotípicos y fenotípicos en el conjunto de datos pueden representarse u organizarse de cualquier manera conocida en la técnica. En una realización, los datos se visualizan en la forma de un gráfico, por ejemplo, como se muestra en las Figuras 2-3. En este tipo de representación, el eje de las y representa la tasa de cambio en CI_{50} de un virus en el conjunto de datos respecto a un virus de referencia. Cada punto del gráfico corresponde a un virus en el conjunto de datos. El eje de las x representa el número de mutaciones que tiene un virus en el conjunto de datos. La

posición del punto indica tanto el número de mutaciones como la tasa de cambio en el tratamiento con la terapia anti-viral que tiene el virus, ambos medidos respecto a una cepa de referencia. En otra realización, los datos genotípicos y fenotípicos en el conjunto de datos se visualizan en la forma de un diagrama.

5 En un aspecto, se formula un algoritmo que correlaciona los datos genotípicos con los datos fenotípicos en el conjunto de datos. En una realización, se define un punto de corte fenotípico. En otra realización, el fenotipo es susceptibilidad a un tratamiento anti-viral. En otra realización, el fenotipo es cambio en sensibilidad a un tratamiento anti-viral respecto a un virus de referencia, y el punto de corte es el valor por encima del cual un virus o población de virus se define como fenotípicamente resistente o parcialmente resistente ("PT-R") a la terapia anti-viral y por debajo del cual un virus o población de virus se define como fenotípicamente sensible ("PT-S") a la terapia anti-viral. En determinadas realizaciones, el virus o población de virus PT-R presenta una susceptibilidad reducida al tratamiento anti-viral. En otras realizaciones, el punto de corte es 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces ó 100 veces mayor que la CI_{50} de un virus de referencia. En otra realización, el punto de corte fenotípico es el valor de corte superior o inferior como se ha definido anteriormente. En otra realización, el virus es VIH y la terapia anti-viral es tratamiento con un inhibidor de proteasa. En otra realización, el inhibidor de proteasa es tipranavir.

15 En otra realización, se usa el punto de corte clínico superior o inferior para definir un punto de corte genotípico. En una realización, el número de mutaciones en un virus del conjunto de datos se correlaciona con la susceptibilidad fenotípica del virus. Esto puede hacerse, por ejemplo, usando un gráfico similar al de la Figura 2, como se ha discutido anteriormente. Puede seleccionarse un punto de corte genotípico tal que la mayor parte de los virus que tienen más del número de mutaciones del conjunto de datos son fenotípicamente resistentes o parcialmente resistentes ("PT-R") y la mayor parte de los virus que tienen menos que ese número de mutaciones son fenotípicamente sensibles ("PT-S"). Por definición, un virus del conjunto de datos con un número de mutaciones igual a, o mayor que el corte genotípico es genotípicamente resistente ("GT-R") al tratamiento anti-viral y un virus del conjunto de datos con menos que el corte genotípico es genotípicamente sensible ("GT-S") al tratamiento anti-viral. Así, en una realización, se selecciona un punto de corte genotípico que produce el mayor porcentaje de virus del conjunto de datos que son bien fenotípicamente resistentes y genotípicamente resistentes ("PT-R, GT-R") o fenotípicamente sensibles y genotípicamente sensibles ("PT-S, GT-S").

Aunque este algoritmo simple puede proporcionar una aproximación útil de la relación entre los datos genotípicos y fenotípicos del conjunto de datos, en la mayor parte de los casos habrá un número significativo de cepas que son genotípicamente sensibles pero fenotípicamente resistentes o parcialmente resistentes ("GT-S, PT-R") o genotípicamente resistentes pero fenotípicamente sensibles ("GT-R, PT-S"), como se muestra en las Figuras 2-4. Estos resultados discordantes son una medida de la inexactitud del algoritmo. Así, en algunas realizaciones, el algoritmo se modifica adicionalmente para reducir el porcentaje de resultados discordantes en el conjunto de datos. En una realización, esto se hace eliminando del conjunto de datos cada punto de dato que corresponde a una población de virus que comprende una mezcla de mutaciones incluyendo el tipo salvaje, en una única posición considerada por el algoritmo ensayado. Véase, por ejemplo, la Pub. Pat. U.S. No. 2004/0224307. Esto tiene el efecto de reducir el número de resultados PT-S, GT-R, disminuyendo así el porcentaje global de resultados discordantes y así mejora el ajuste del algoritmo a un conjunto de datos.

40 En otra realización, el porcentaje de resultados discordantes se reduce asignando valores de ponderación diferenciales a una o más mutaciones observadas en el conjunto de datos. Un algoritmo que no incluye esta etapa asume que cada mutación en el conjunto de datos contribuye de la misma manera a la resistencia global de un virus o población de virus a una terapia anti-viral. En muchos casos, esto no será cierto. Por ejemplo, puede haber una mutación en un conjunto de datos que casi siempre se correlacione con resistencia fenotípica a un tratamiento anti-viral. Esto es, casi cada virus que tiene la mutación es fenotípicamente resistente al tratamiento anti-viral, incluso aquellas cepas que sólo tienen una o dos mutaciones totales. En una realización, dichas mutaciones se "ponderan", por ejemplo, se les asigna una puntuación de mutación incrementada. A una mutación se le puede asignar una ponderación, por ejemplo, de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más. Por ejemplo, una mutación a la que se ha asignado una ponderación de 2 puede contarse como dos mutaciones en un virus. También pueden asignarse valores de ponderación fraccionados. En determinadas realizaciones, puede asignarse un valor entre cero y uno cuando una mutación está asociada débilmente con susceptibilidad reducida al tratamiento anti-viral. En otra realización, pueden asignarse valores menores de cero, en el que una mutación está asociada con una sensibilidad incrementada del virus al tratamiento anti-viral.

55 Un experto en la técnica apreciará que hay una compensación implicada en la asignación de una ponderación incrementada a determinadas mutaciones. Al incrementarse la ponderación de la mutación, el número de resultados discordantes GT-R, PT-S puede incrementar. Así, la asignación de una ponderación a una mutación que es demasiado alta puede incrementar la discordancia global del algoritmo. De acuerdo con esto, en una realización, se asigna una ponderación a una mutación que equilibre la reducción de los resultados GT-S, PT-R con el incremento de los resultados GT-R, PT-S.

En otra realización, también se considera en el algoritmo la interacción de diferentes mutaciones entre sí en el conjunto de datos. Por ejemplo, podría encontrarse que dos o más mutaciones se comportan sinérgicamente, es decir, que la coincidencia de las mutaciones en un virus contribuye más significativamente a la resistencia del virus que lo se predeciría tomando como base el efecto de cada mutación independientemente de la otra. Alternativamente, podría encontrarse que la coincidencia de dos o más mutaciones en un virus contribuye menos significativamente a la resistencia del virus de lo que se esperaría a partir de lo que harían las contribuciones a la resistencia de cada mutación cuando ocurren independientemente. También, puede encontrarse que dos o más mutaciones aparecen más frecuentemente juntas que como mutaciones independientes. Así, en una realización, las mutaciones que aparecen conjuntamente se ponderan conjuntamente. Por ejemplo, sólo se asigna a una de las mutaciones una ponderación de 1 o mayor, y a la otra mutación o mutaciones se les asigna una ponderación de cero, con el fin de evitar un incremento en el número de resultados discordantes GT-R, PT-S.

En otro aspecto, el punto de corte fenotípico puede usarse para definir un punto de corte genotípico correlacionando el 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 no están limitadas a, mutaciones de aminoácidos primarias, mutaciones de aminoácidos secundarias, mutaciones en las que la carga neta del polipéptido se conserva y mutaciones que no alteran la polaridad, hidrofobicidad o hidrofiliidad del aminoácido en una posición particular. Otras clases de mutaciones que están en el alcance de la invención serán evidentes para un experto en la técnica, tomando como base las enseñanzas de la presente memoria.

En una realización, se construye un algoritmo que considera el requerimiento de una o más clases de mutaciones. En otra realización, el algoritmo considera el requerimiento de un número mínimo de una o más clases de mutaciones. En otra realización, el algoritmo considera el requerimiento de un número mínimo de mutaciones primarias o secundarias. En otra realización, el requerimiento de una mutación primaria o una secundaria en combinación con otras mutaciones también es considerado por el algoritmo. Por ejemplo, podría encontrarse que un virus con una combinación particular de mutaciones es resistente a un tratamiento anti-viral, mientras que un virus con cualquier mutación en esa combinación, sola o con otras mutaciones que no son parte de la combinación, no es resistente al tratamiento anti-viral.

Usando, por ejemplo, los métodos discutidos anteriormente, puede diseñarse el algoritmo para conseguir cualquier resultado deseado. En una 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 ó 100 - (porcentaje de los grupos PT-S, GT-R + PT-R, GT-S)). En algunas realizaciones, la concordancia global es mayor de 75%, 80%, 85%, 90% ó 95%. En una realización, el algoritmo se diseña para minimizar el porcentaje de resultados PT-R, GT-S. En otra realización, el algoritmo se diseña para minimizar el porcentaje de resultados PT-S, GT-R. En otra realización, el algoritmo se diseña para maximizar el porcentaje de resultados PT-S, GT-S. En otra realización, el algoritmo se diseña para maximizar el porcentaje de resultados PT-R, GT-R.

En cualquier momento durante la construcción del algoritmo, o después de que se haya construido, puede ensayarse adicionalmente en un segundo conjunto de datos. En una realización, el segundo conjunto de datos consiste en virus que no están incluidos en el conjunto de datos, es decir, el segundo conjunto de datos es un conjunto de datos nuevo. En otra realización, el segundo conjunto de datos contiene uno o más virus que estaban en el conjunto de datos y uno o más virus que no estaban en el conjunto de datos. El uso del algoritmo en un segundo conjunto de datos, particularmente un conjunto de datos nuevo, permite evaluar la capacidad predictiva del algoritmo. Así, en una realización, la exactitud de un algoritmo se evalúa usando un segundo conjunto de datos, y las normas del algoritmo se modifican como se ha descrito anteriormente para mejorar su exactitud. En otra realización, se usa una estrategia iterativa para crear el algoritmo, mediante la cual se ensaya un algoritmo y se modifica repetidamente hasta que se consigue un nivel deseado de exactitud.

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

En otro aspecto, la presente invención 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 a un tratamiento anti-viral tomando como base el genotipo del virus. En una realización, el método comprende detectar, en el virus o derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a tipirnavir, aplicando las normas del algoritmo a las mutaciones detectadas asociadas con susceptibilidad alterada a tipirnavir, en el que un virus que satisface las normas del algoritmo es genotípicamente resistente o parcialmente resistente al tratamiento anti-viral, y un virus que no satisface las normas del algoritmo es genotípicamente sensible al tratamiento anti-viral. En determinadas realizaciones, un virus que es parcialmente resistente o resistente al tratamiento presenta una susceptibilidad reducida al tratamiento.

En otra realización, el método comprende detectar, en el virus o derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a tipirnavir, aplicando las normas del algoritmo a las mutaciones

detectadas, en el que una puntuación igual a, o mayor que la puntuación de corte genotípico indica que el virus es genotípicamente resistente o parcialmente resistente al tratamiento anti-viral y una puntuación menor que la puntuación de corte genotípico indica que el virus es genotípicamente sensible al tratamiento anti-viral. En determinadas realizaciones, un virus que es parcialmente resistente o resistente al tratamiento presenta una susceptibilidad reducida al tratamiento.

5

En otra realización más, el método comprende detectar, en el virus o derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a tipranavir, aplicando las normas del algoritmo a las mutaciones detectadas, en el que una puntuación menor de cero indica que el virus presenta una susceptibilidad incrementada al tratamiento anti-viral.

10 El algoritmo de esta invención puede usarse para cualquier enfermedad viral en la que la susceptibilidad a fármacos anti-virales es una preocupación, como se ha discutido anteriormente. En determinadas realizaciones, el ensayo de la invención puede usarse para determinar la susceptibilidad de un retrovirus a un fármaco anti-viral. En una realización, el retrovirus es VIH. Preferiblemente, el virus es VIH-1.

15 El agente anti-viral de la invención podría ser cualquier tratamiento eficaz frente a un virus. Es útil para la práctica de esta invención, por ejemplo, entender la estructura, ciclo celular y elementos genéticos de los virus que pueden ensayarse en el ensayo de susceptibilidad a fármacos de esta invención. Éstos serán conocidos para un experto en la técnica y proporcionan, por ejemplo, enzimas clave y otras moléculas frente a las que puede dirigirse el agente anti-viral. Los ejemplos de agentes anti-virales incluyen, pero no están limitados a, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa tales como AZT, ddl, ddC, d4T, 3TC, abacavir, inhibidores nucleótidos de la transcriptasa inversa tales como tenofovir, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa tales como nevirapina, efavirenz, delavirdina, inhibidores de la fusión tal como T-20 y T-1249 e inhibidores de proteasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir, lopinavir y tipranavir.

20

En algunas realizaciones de la invención, los agentes anti-virales están dirigidos a retrovirus. En determinadas realizaciones, los agentes anti-virales son inhibidores de proteasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir, lopinavir y tipranavir. En una realización, el agente anti-viral es tipranavir.

25

Cualquier mutación, sin limitación, asociada con susceptibilidad reducida a tratamiento con un agente anti-viral conocidos para los expertos en la técnica puede usarse en los algoritmos de la invención. Las mutaciones adicionales útiles en los algoritmos de la invención pueden determinarse por métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, las Tablas 2 y 3 proporcionan una lista de mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir.

30 5.9 Uso de un algoritmo para predecir la eficacia de un tratamiento anti-viral para un individuo

En otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para usar un algoritmo de la invención para predecir la eficacia de un tratamiento anti-viral para un individuo infectado con un virus basado en el genotipo del virus. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar, en el virus o derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones asociadas con susceptibilidad alterada a un fármaco anti-viral, aplicando las normas del algoritmo a las mutaciones detectadas, en el que un virus que satisface las normas del algoritmo presenta susceptibilidad reducida al tratamiento anti-viral y un virus que no satisface las normas del algoritmo es genotípicamente sensible al tratamiento anti-viral, identificando de esta manera la eficacia del tratamiento anti-viral. En determinadas realizaciones, el virus que presenta susceptibilidad reducida al tratamiento es parcialmente resistente. . En determinadas realizaciones, el virus que presenta susceptibilidad reducida al tratamiento es resistente. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar, en el virus o un derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones, aplicando las normas del algoritmo a las mutaciones detectadas, en el que una puntuación igual a, o mayor que la puntuación de corte genotípico indica que el virus presenta susceptibilidad reducida al tratamiento anti-viral y una puntuación menor que la puntuación de corte genotípico indica que el virus es genotípicamente sensible al tratamiento anti-viral. En determinadas realizaciones, el virus que presenta susceptibilidad reducida al tratamiento es parcialmente resistente.

35

40

45

Como se ha descrito anteriormente, el algoritmo de la invención puede usarse para cualquier enfermedad viral en la que la susceptibilidad a fármacos anti-virales sea una preocupación y el agente anti-viral de la invención podría ser cualquier tratamiento eficaz frente a un virus. En determinadas realizaciones, el ensayo de la invención se usa para determinar la susceptibilidad de un retrovirus a un fármaco anti-viral. En una realización preferida, el retrovirus es VIH. Preferiblemente, el virus es VIH-1. En algunas realizaciones de la invención, los agentes anti-virales están dirigidos a retrovirus. En determinadas realizaciones, los agentes anti-virales con inhibidores de proteasa tales como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir y lopinavir. En una realización, el agente anti-viral es tipranavir.

50

Como se ha descrito anteriormente, las mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tratamiento con un agente anti-viral pueden obtenerse de la técnica o determinarse por métodos descritos en las Secciones 5.3-5.8.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para monitorizar la eficacia de un tratamiento anti-viral en un individuo infectado con un virus y que está sometido o se ha sometido a tratamiento previo con el mismo tratamiento anti-viral o uno diferente, que comprende, detectar, en una muestra de dicho individuo, la presencia o ausencia de un residuo de aminoácido asociado con susceptibilidad reducida a tratamiento con el tratamiento anti-viral, en el que la presencia del residuo se correlaciona con una susceptibilidad reducida a tratamiento con el tratamiento anti-viral.

5.10 Correlación de la susceptibilidad a un tratamiento anti-viral con susceptibilidad a otro tratamiento anti-viral

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para usar un algoritmo de la invención para predecir la eficacia de un tratamiento anti-viral frente a un virus basado en la susceptibilidad genotípica del virus a un tratamiento anti-viral diferente. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar, en el virus o un derivado de un virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones correlacionadas con susceptibilidad alterada a un tratamiento anti-viral y aplicar las normas de un algoritmo de la invención a las mutaciones detectadas, en el que un virus que satisface las normas del algoritmo es genotípicamente resistente o parcialmente resistente al tratamiento anti-viral y un virus que no satisface las normas del algoritmo es genotípicamente sensible al tratamiento anti-viral. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar, en el virus o un derivado del virus, la presencia o ausencia de una o más mutaciones correlacionadas con susceptibilidad alterada a un tratamiento anti-viral y aplicar las normas del algoritmo a las mutaciones detectadas, en el que una puntuación igual a, o mayor que la puntuación de corte genotípico indica que el virus es genotípicamente resistente o parcialmente resistente a un tratamiento anti-viral diferente y una puntuación menor que la puntuación de corte genotípico indica que el virus es genotípicamente sensible a un tratamiento anti-viral diferente. En otra realización, los dos tratamientos anti-virales afectan a la misma proteína viral. En otra realización, los dos tratamientos anti-virales son ambos inhibidores de proteasa. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen, pero no están limitados a, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir, lopinavir y tipranavir. En otra realización más, uno de los dos tratamientos anti-virales es tipranavir. En otra realización más, una mutación correlacionada con resistencia a un inhibidor de proteasa también está correlacionada con resistencia a otro inhibidor de proteasa.

5.11 Métodos implementados por ordenador

En un aspecto, la presente invención proporciona un método implementado por ordenador para identificar un VIH-1 como menos susceptible a terapia con tipranavir en un sujeto infectado con el VIH-1. Típicamente, los datos que representan el genotipo de VIH-1 se reciben como una entrada por un sistema de ordenador. Por ejemplo, los datos pueden introducirse por un teclado. Como otro ejemplo, los datos pueden recibirse electrónicamente desde un dispositivo usado para el propósito de genotipado de ácidos nucleicos. Típicamente, el genotipado de los ácidos nucleicos de VIH se resuelve por métodos electroforéticos usando reacciones de química de terminación con colorante, aunque son posibles otras opciones incluyendo patrones de hibridación de un ácido nucleico de VIH en una matriz de oligonucleótidos. Así, los datos recibidos como entrada pueden representar migraciones electroforéticas o patrones de hibridación que pueden convertirse en una representación de un genotipo.

Las realizaciones del método implementado por ordenador comprenden llevar a cabo una comparación del genotipo del VIH-1 con una base de datos que representa mutaciones pertinentes asociadas con susceptibilidad alterada a inhibidores de proteasa. En realizaciones preferidas, la base de datos comprende representaciones de codones de proteasa mutantes L10I/V, I13V, K20M/V/R, L24I, D30N, V32I, L33F, E35G, M36I, K43T, M46I/L, I47V, I50L/V, I54A/L/M/V, Q58E, H69K, A71L, G73T, T74P, L76V, V82I/L/T, N83D, I84V, L89V y/o L90M. La realización de una comparación entre el genotipo del VIH-1 y la base de datos puede realizarse en cualquier orden secuencial, sin limitación, y no depende de consideraciones tales como posición de los aminoácidos en la proteasa o si una posición particular representa un sitio de una mutación primaria o secundaria; sólo se requiere que la realización de una comparación se haga de tal manera que puedan determinarse las condiciones indicadas.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar que es probable que un VIH-1 sea resistente a tipranavir, que comprende introducir en un sistema de ordenador un genotipo de proteasa de VIH-1 del VIH-1 y comparar, de esta manera el genotipo de la proteasa del VIH-1 con una base de datos en el sistema de ordenador que comprende una correlación entre la presencia de una mutación en 10, 11, 13, 20, 24, 30, 32, 33, 35, 36, 43, 46, 47, 50, 54, 58, 69, 71, 73, 74, 76, 82, 83, 84, 89 y/o 90 y susceptibilidad alterada a tipranavir, calcular una puntuación de mutación, en la que si la puntuación de mutación es igual a o mayor que una puntuación de corte, se determina que el VIH-1 es resistente a tipranavir. En determinadas realizaciones, la mutación es L10I/V, I13V, K20M/V/R, L24I, D30N, V32I, L33F, E35G, M36I, K43T, M46I/L, I47V, I50L/V, I54A/L/M/V, Q58E, H69K, A71L, G73T, T74P, L76V, V82I/L/T, N83D, I84V, L89V y/o L90M.

En una realización, un método implementado por ordenador comprende determinar si se cumple una condición de que la puntuación de mutación es igual a o mayor que una puntuación de corte.

En otro aspecto, la invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar si un VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida a tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, que comprende introducir en un sistema de ordenador un genotipo de proteasa de VIH-1 del VIH-1 y comparar el genotipo de la proteasa del VIH-1 con una base de datos en el sistema de ordenador que comprende una correlación entre la presencia de una mutación en la posición de aminoácido 10, 11, 32, 36, 46, 55, 60, 71, 73, 84, 89 y/o 90 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa y susceptibilidad reducida a tratamiento con el inhibidor de proteasa, determinando de esta manera si el VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad reducida al inhibidor de proteasa.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con susceptibilidad reducida a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L1I, V11L, V32I, M46I, K55R, D60E, A71L, G73T, I84V, L89V y L90M.

En otro aspecto, la invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar si un VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener susceptibilidad incrementada a tratamiento con un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir, que comprende introducir en un sistema de ordenador un genotipo de proteasa de VIH-1 del VIH-1 y comparar el genotipo de la proteasa del VIH-1 con una base de datos en el sistema de ordenador que comprende una correlación entre la presencia de una mutación en la posición de aminoácido 10, 24, 30, 50, 54, 76, 82 y/o 88 de la secuencia de aminoácidos de dicha proteasa y susceptibilidad incrementada a tratamiento con el inhibidor de proteasa, determinando de esta manera si el VIH-1 tiene una probabilidad incrementada de tener una susceptibilidad incrementada al inhibidor de proteasa.

En algunas realizaciones, la mutación asociada con susceptibilidad incrementada a tratamiento con dicho inhibidor de proteasa se selecciona del grupo que consiste en: L10F, L24I, D30N, I50L/V, I54L, L76V, V82I y N88D.

Los métodos implementados por ordenador descritos en la presente memoria pueden implementarse en cualquier ordenador que es conocido para los expertos en la técnica, sin limitación. Se reconocerá que los métodos implementados descritos en la presente memoria no dependen de un tipo particular de ordenador, elementos de almacenamiento de memoria, velocidades de procesamiento, lenguajes de programación, compiladores, otro hardware informático, software o periféricos, y semejantes.

En determinadas realizaciones, los métodos implementados por ordenador comprenden visualizar un resultado que indica si se determina que el VIH-1 es menos susceptible o no a terapia con tipranavir en un sujeto infectado con el VIH-1. Se entiende generalmente que se usa un dispositivo de salida para la visualización de los resultados obtenidos usando los métodos implementados por ordenador de la invención. Los dispositivos de salida pueden ser cualquier tipo de impresoras, pantallas de ordenador, unidades de disco, grabadoras de CD, otros ordenadores, o módulos de memoria accesibles por otro ordenador, y semejantes, sin limitación. La visualización de un resultado puede ser cualquier visualización conocida para los expertos en la técnica sin limitación.

En determinadas realizaciones, el resultado se visualiza en un medio tangible. Típicamente, los resultados se visualizan en pantallas de ordenador, impresiones, CD y semejantes. En determinadas realizaciones, el resultado se produce como datos en un medio tangible. En determinadas realizaciones, el medio tangible es un papel, por ejemplo, una impresión de ordenador. En determinadas realizaciones, el medio tangible es una memoria legible por ordenador, por ejemplo, una memoria de acceso aleatorio, una unidad de disco fijo, un disquete, un disco compacto, un iPod™, una memoria flash, etc.

5.12 Otros métodos

Los expertos en la técnica reconocerán el valor de proporcionar la información que puede obtenerse usando los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, pueden evitarse los regímenes de tratamiento con fármacos anti-virales costosos pero ineficaces con el conocimiento de que un VIH-1 es resistente o parcialmente resistente, presentando una susceptibilidad reducida, a un inhibidor de proteasa, tal como tipranavir.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método que comprende determinar si es probable que un VIH-1 sea resistente o parcialmente resistente a un inhibidor de proteasa según un método de la invención, proporcionando entonces información que describe si un VIH-1 tomado de un sujeto infectado con VIH-1 es resistente o parcialmente resistente a tipranavir. Esta información puede proporcionarse al sujeto o a un profesional sanitario. En determinadas realizaciones, la información comprende además informar al sujeto o al profesional sanitario de la opción de tratamiento para tratar al sujeto con tipranavir. En determinadas realizaciones, la información comprende además recomendar al sujeto o al profesional sanitario tratar al sujeto con tipranavir. En determinadas realizaciones, la información comprende además recomendar al sujeto o al profesional sanitario no tratar al sujeto con tipranavir.

En una realización, el método comprende obtener un genotipo para el ácido nucleico que codifica la proteasa de VIH-1. Esto puede realizarse, por ejemplo, determinando el genotipo del ácido nucleico que codifica la proteasa del sujeto

infectado con VIH-1 y usando técnicas como se describe en la presente memoria, o, por ejemplo, recibiendo información genotípica acerca de la proteasa del VIH-1 de otro que genotipó el VIH-1.

5 En otra realización, el método comprende identificar la presencia o ausencia de una mutación en la proteasa de VIH-1 que es L10I/V, I13V, K20M/V/R, L24I, D30N, V32I, L33F, E35G, M36I, K43T, M46I/L, I47V, I50L/V, I54A/L/M/V, Q58E, H69K, A71L, G73T, T74P, L76V, V82I/L/T, N83D, I84V, L89V y/o L90M y detectar si es probable que el VIH-1 sea resistente o parcialmente resistente a tipranavir.

En una realización, el método comprende además preparar un medio tangible que indica si el VIH-1 es resistente o parcialmente resistente a tipranavir.

En una realización, el método comprende además transmitir el medio tangible al sujeto o a un profesional sanitario.

10 5.13 Dispositivos y sistemas

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema de ordenador que se configura para llevar a cabo los métodos implementados por ordenador descritos anteriormente. Los ordenadores son particularmente útiles en la realización de los presentes métodos dada la cantidad de datos de genotipo en combinación con la rapidez de los ordenadores para llevar a cabo algoritmos.

15 En una realización, el sistema de ordenador comprende un ordenador de mesa que ejecuta un sistema operativo Microsoft WINDOWS®.

En una realización, el sistema de ordenador comprende software escrito en PERL.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una visualización en papel del resultado producido por los métodos descritos en la presente memoria.

20 En otro aspecto más, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende instrucciones legibles por ordenador para llevar a cabo los métodos implementados por ordenador discutidos anteriormente. Una realización es un CD. Otra realización es un CD en el que las instrucciones legibles por ordenador están en PERL.

La Fig. 11 detalla un sistema ejemplar que soporta la funcionalidad descrita anteriormente. El sistema es preferiblemente un sistema de ordenador 10 que tiene:

- 25 • una unidad procesadora central 22;
- una unidad de almacenamiento principal no volátil 14, por ejemplo, una unidad de disco duro, para almacenar software y datos, la unidad de almacenamiento 14 controlada por el controlador de almacenamiento 12;
- 30 • una memoria del sistema 36, preferiblemente memoria de acceso aleatorio (RAM) de alta velocidad, para almacenar programas de control del sistema, datos, y programas de aplicación, que comprende programas y datos cargados de la unidad de almacenamiento no volátil 14; la memoria del sistema 36 también puede incluir memoria sólo de lectura (ROM);
- una interfaz de usuario 32, que comprende uno o más dispositivos de entrada (por ejemplo, teclado 28) y un monitor 26 u otro dispositivo de salida;
- 35 • una tarjeta de interfaz de red 20 para conectar a cualquier red de comunicación con cable inalámbrica 34 (por ejemplo, una red de área amplia tal como Internet);
- un bus interno 30 para interconectar los elementos del sistema mencionados anteriormente; y
- una fuente de energía 24 para alimentar los elementos mencionados anteriormente.

40 La operación del ordenador 10 está controlada principalmente por el sistema operativo 40, que se ejecuta por la unidad de procesamiento central 22. El sistema operativo 40 puede almacenarse en la memoria del sistema 36. Además del sistema operativo 40, en una memoria del sistema de implementación típica 36 incluye:

- sistema de ficheros 42 para controlar el acceso a los distintos ficheros y estructuras de datos usados por la presente invención;
- una estructura de datos 44 para almacenar perfiles según la presente invención; y

- un módulo de algoritmo de análisis de datos 54 para comparar los perfiles según la presente invención.

Como se ilustra en la Fig. 11, el ordenador 10 comprende módulos de programas de software y estructuras de datos. Cada una de las estructuras de datos puede comprender cualquier forma de sistema de almacenamiento de datos incluyendo, pero no limitado a, un fichero plano ASCII o binario, una hoja de cálculo Excel, una base de datos relacional (SQL) o una base de datos de procesamiento analítica en línea (OLAP) (MDX y/o variantes de ésta). En algunas realizaciones específicas, dichas estructuras de datos están cada una en la forma de una o más bases de datos que incluyen una estructura jerárquica (por ejemplo, un esquema estrella). En algunas realizaciones, dichas estructuras de datos están cada una en la forma de bases de datos que no tienen una jerarquía explícita (por ejemplo, tablas de dimensión que no están organizadas jerárquicamente).

En algunas realizaciones, cada una de las estructuras de datos almacenadas o accesibles para el sistema 10 son estructuras de datos únicas. En otras realizaciones, dichas estructuras de datos comprenden de hecho una pluralidad de estructuras de datos (por ejemplo, bases de datos, ficheros, archivos) que pueden o no estar todas alojadas en el mismo ordenador 10. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la estructura de datos 44 comprende una pluralidad de hojas de cálculo Excel que están almacenadas en el ordenador 10 y/o en ordenadores que son accesibles por el ordenador 10 a través de la red de área amplia 34. En otro ejemplo, la estructura de datos 44 comprende una base de datos que está almacenada en el ordenador 10 o está distribuida en uno o más ordenadores que son accesibles por el ordenador 10 a través de la red de área amplia 34.

Se apreciará que muchos de los módulos y estructuras de datos ilustrados en la Figura 22 pueden estar localizados en uno o más ordenadores remotos. Por ejemplo, algunas realizaciones de la presente solicitud son implementaciones de tipo servicio web. En dichas realizaciones, un módulo de algoritmo de análisis de datos 54 y/o otros módulos pueden residir en un ordenador cliente que está en comunicación con el ordenador 10 a través de la red 34. En algunas realizaciones, por ejemplo, un módulo de algoritmo de análisis de datos 54 puede ser una página web interactiva.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de programa de ordenador que comprende uno o más códigos de ordenador que identifican un VIH-1 como menos susceptible a tratamiento con tipranavir en un sujeto infectado con VIH-1 y un medio legible por ordenador que almacena los códigos de ordenador. En una realización, el programa de ordenador comprende un código de ordenador que recibe entradas correspondientes al genotipo del ácido nucleico de VIH-1 que codifica la proteasa de VIH-1. La entrada puede representar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de VIH-1, por ejemplo, una lista de bases. La entrada puede convertirse a partir de un patrón de hibridación del ácido nucleico de VIH-1 en una matriz de sondas de oligonucleótidos unida a una fase sólida. La entrada puede convertirse a partir de un secuenciador automatizado que detecta la migración electroforética.

En otra realización, el programa de ordenador comprende un código de ordenador que lleva a cabo una primera comparación para determinar si un aminoácido codificado por los codones de la proteasa de VIH-1 10, 11, 13, 20, 24, 30, 32, 33, 35, 36, 43, 46, 47, 50, 54, 58, 69, 71, 73, 74, 76, 82, 83, 84, 89 y/o 90 concuerda con uno o más de los aminoácidos mutantes L10I/V, I13V, K20M/V/R, L24I, D30N, V32I, L33F, E35G, M36I, K43T, M46I/L, I47V, I50L/V, I54A/L/M/V, Q58E, H69K, A71L, G73T, T74P, L76V, V82I/L/T, N83D, I84V, L89V y/o L90M y un código de ordenador que calcula una puntuación de mutación basada en el número de mutaciones presente.

En otra realización, el programa de ordenador comprende un código de ordenador que determina si se cumple una condición tal que la puntuación de mutación es igual a o mayor que la puntuación de corte.

En otra realización, el programa de ordenador comprende un código de ordenador que transmite un resultado que representa si el VIH-1 se identifica o no como menos susceptible a tratamiento con tipranavir a un dispositivo de salida. Un dispositivo de salida puede ser cualquiera de los conocidos por los expertos en la técnica, sin limitación, tal como una impresora, una unidad de disco, una pantalla de ordenador, otro ordenador y así sucesivamente.

En un aspecto, la presente invención proporciona un medio tangible que almacena el resultado transmitido a un dispositivo de salida como se ha descrito anteriormente. Un medio tangible puede ser cualquier medio tangible conocido para los expertos en la técnica sin limitación. Un medio tangible puede ser un CD o DVD. Un medio tangible puede ser una impresión. Un tangible puede ser un medio legible por ordenador como se ha descrito anteriormente.

6. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar determinados aspectos de la presente invención y no se pretende que limiten el contenido de ésta.

6.1 Ejemplo 1: análisis de muestras de pacientes para identificar mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir

Este ejemplo demuestra un método para analizar muestras de pacientes para identificar mutaciones que están asociadas bien con susceptibilidad incrementada o disminuida a inhibidores de proteasa tal como tipranavir.

5 Con el fin de determinar la relación entre una secuencia de proteasa de una cepa de VIH-1 y su susceptibilidad a tratamiento con tipranavir, se analizó un conjunto de datos que consiste en 1.411 muestras de pacientes genotípicamente así como fenotípicamente. Las muestras de los pacientes contenían al menos una mutación de resistencia a inhibidor de proteasa (L23X, L24X, D30X, V32X, M46X, I47X, G48X, I50X, I54X, V82A, V82F, V82S, V82T, V82C, V82G, V82L, V82M, I84X, N88X, L90X, en los que X es cualquier aminoácido de tipo no salvaje). Además, la muestra del paciente contenía no más de una mezcla de residuos de aminoácidos en una o más posiciones asociadas con susceptibilidad alterada a tipranavir usada en el estudio Kohlbrenner (Kohlbrenner *et al.*, presentación en reunión titulada "Tipranavir Mutation Score Predicts ViroLogic Success in PI-Experienced HIV-Positive Adults", presentada en HIV DART Conference (diciembre 2004)). En Kohlbrenner *et al.*, 10V, 13V, 20M/R/V, 33F, 35G, 36I, 43T, 46L, 47V, 54A/M/V, 58E, 69K, 74P, 82L/T, 83D y 84V de la proteasa de VIH-1 se identificaron como mutaciones asociadas con resistencia alterada a tipranavir, como se muestra en la Fig. 1. Estos resultados se publicaron posteriormente como Baxter *et al.*, 2006, *J Virol* 80: 10794-801.

El ensayo fenotípico se realizó usando el ensayo de VIH PHENOSENSE™ (Monogram Biosciences, Inc, South San Francisco, CA) (Petropoulos *et al.*, 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 920-928; Patentes U.S. Nos. 5.837.464 y 6.242.187 y Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US06/05512). Se recogieron muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1. Se obtuvieron los valores CI_{50} para tipranavir para el VIH-1 de la muestra del paciente. Éstos se compararon con la CI_{50} para tipranavir frente a la cepa viral de referencia NL4-3 (GenBank No. de Registro AF324493). Los datos fenotípicos se expresaron como "tasa de cambio" (o log de tasa de cambio) de concentración inhibidora un 50% (CI_{50}) de tipranavir. Los valores de tasa de cambio de CI_{50} se calcularon dividiendo la CI_{50} de tipranavir frente al VIH-1 de la muestra de plasma del paciente por la CI_{50} para tipranavir frente a la cepa viral de referencia NL4-3 (GenBank No. de Registro AF324493).

Con el fin de definir los cambios genotípicos correlacionados con susceptibilidad reducida a tipranavir, se analizaron las secuencias completas de aminoácidos de las proteasas de VIH-1 en cada una de las muestras de los pacientes. Las mutaciones se compararon con la secuencia de la proteasa de la cepa de referencia NL4-3 (GenBank No. de Registro AF324493).

30 6.2 Ejemplo 2: correlación de susceptibilidad a tipranavir con el número de mutaciones en la proteasa de VIH-1

Este ejemplo muestra un algoritmo simple que correlaciona el número de mutaciones con la misma ponderación en el gen de la proteasa de un VIH-1 con su susceptibilidad a tipranavir, tal como se describe en el estudio Kohlbrenner, no predice perfectamente la resistencia.

35 Se analizó un conjunto de datos de 1.411 muestras de plasma de pacientes y se identificaron las mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir, como se describe en el Ejemplo 1. Los datos del genotipo se obtuvieron secuenciando la proteasa del VIH-1 presente en la muestra de cada paciente y determinando los cambios en la secuencia respecto a la secuencia del VIH NL4-3 (GenBank No. de Registro AF324493).

La susceptibilidad fenotípica a tipranavir (Log de la tasa de cambio de tipranavir) se analizó como una función del número de mutaciones en la proteasa del VIH-1 presente en la muestra de plasma de un paciente. La tasa de cambio (FC) para cada muestra se calculó dividiendo la CI_{50} de tipranavir frente al VIH-1 de la muestra de plasma del paciente por la CI_{50} para tipranavir frente a la cepa viral de referencia NL4-3 (GenBank No. de Registro AF324493). A las muestras con resistencia a tipranavir fuera de escala se les asignó un valor de FC de 100.

45 Las muestras se agruparon tomando como base una puntuación de mutación, que se calcula sumando el número de las mutaciones asociadas con resistencia a tipranavir descritas en el estudio Kohlbrenner. Se calculó la FC mediana para cada grupo.

La Tabla 1 muestra la relación entre la resistencia a tipranavir y el número de mutaciones asociadas a resistencia. Las mutaciones usadas en este análisis fueron las identificadas en el estudio Kohlbrenner. Como se muestra en la Tabla 1, entre las 1.411 muestras de pacientes en el conjunto de datos, 202 muestras tenían una puntuación de mutación de cero con una FC mediana para tipranavir de 0,7; 308 muestras tenían una puntuación de mutación de uno con una FC mediana para tipranavir de 0,8; 241 muestras tenían una puntuación de mutación de dos con una FC mediana para tipranavir de 1,1; 218 muestras tenían una puntuación de mutación de tres con una FC mediana para tipranavir de 1,6; 187 muestras tenían una puntuación de mutación de cuatro con una FC mediana para tipranavir de 3,0; 119 muestras tenían una puntuación de mutación de cinco con una FC mediana para tipranavir de 5,7; 81 muestras tenían una

puntuación de mutación de seis con una FC mediana para tipranavir de 8,8; 218 muestras tenían una puntuación de mutación de siete con una FC mediana para tipranavir de 12; y 22 muestras tenían una puntuación de mutación de ocho o nueve con una FC mediana para tipranavir de 24. Los resultados mostraron que la FC para tipranavir de las muestras se incrementaba con un número creciente de mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir.

- 5 La Fig. 2 y Fig. 3 muestran la susceptibilidad a tipranavir (Log FC para tipranavir) como una función del número de mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir. Usando la puntuación de mutación del estudio Kohlbrenner, y un corte fenotípico de 4 veces, la discordancia mínima se observó usando un corte de puntuación de mutación de cuatro o más mutaciones en estas dieciséis posiciones; por lo tanto, si el número de estas mutaciones era cuatro o más, se predecía que el virus presentaba susceptibilidad reducida a tratamiento con tipranavir.
- 10 La Fig. 2 muestra los resultados cuando el corte de la puntuación de mutación es cinco y un VIH-1 se define como resistente o parcialmente resistente a tratamiento con tipranavir si su FC para tipranavir es mayor de o igual a 4. El cuadrante inferior izquierdo corresponde a aquellos virus que contienen menos de cinco mutaciones en su proteasa y que son fenotípicamente y genotípicamente sensibles (PT-S, GT-S) a tipranavir. El 73% de las 1.411 muestras se encontró en este cuadrante. El cuadrante superior derecho corresponde a aquellos virus que contienen cinco o más mutaciones y que son fenotípicamente y genotípicamente resistentes o parcialmente resistentes (PT-R, GT-R) a tipranavir (tasa de cambio para tipranavir ≥ 4) y contenía el 13% de las muestras.

15 Sin embargo, los otros dos cuadrantes corresponden a las "excepciones" en las que se predecía que un virus era sensible tomando como base el genotipo (número de mutaciones), pero era fenotípicamente (tomando como base la tasa de cambio para tipranavir) resistente o parcialmente resistente (superior izquierda, PT-R, GT-S) o en las que se predecía que un virus era resistente o parcialmente resistente tomando como base el genotipo, pero que era fenotípicamente (tomando como base la tasa de cambio para tipranavir) sensible (inferior derecha, PT-S, GT-R).

20 En la Fig. 2, el 9% del conjunto de partida, con cero a cuatro mutaciones, al contrario de las expectativas, se encontró en el cuadrante superior izquierdo (PT-R, GT-S) y presentó valores de CI_{50} tan altos como 4 a 100 veces mayores que la CI_{50} para la cepa de referencia (log de tasa de cambio es 1-2). Al contrario, el 5% de las muestras de virus que tenían cinco, seis, siete, ocho o nueve mutaciones no presentaron ninguna susceptibilidad reducida a tipranavir que el corte y de esta manera aparecieron en el cuadrante inferior derecho (PT-S, GT-R).

25 La Fig. 3 muestra los resultados cuando la puntuación de mutación de corte es 4; un VIH-1 se definió como que tiene una susceptibilidad reducida a tratamiento con tipranavir si su FC para tipranavir es mayor de o igual a 2. El cuadrante inferior izquierdo corresponde a aquellos virus que contienen cuatro o menos mutaciones en su proteasa y que son fenotípicamente y genotípicamente sensibles (PT-S, GT-S) a tipranavir. El 58% de las 1.411 muestras se encontró en este cuadrante. El cuadrante superior derecho corresponde a aquellos virus que contienen cuatro o más mutaciones y que fenotípicamente y genotípicamente tienen una susceptibilidad reducida (PT-R, GT-R) a tipranavir (tasa de cambio para tipranavir ≥ 2) y contenía el 24% de las muestras. El 8% de las muestras, con cero a tres mutaciones, al contrario de las expectativas, se encontró en el cuadrante superior izquierdo (PT-R, GT-S) y presentó valores de CI_{50} tan altos como 2 a 100 veces mayores que la CI_{50} para la cepa de referencia (log de la tasa de cambio 1-2). Al contrario, el 10% de las muestras de virus que tenían cuatro, cinco, seis, siete ocho o nueve mutaciones no presentó ninguna susceptibilidad reducida a tipranavir que el corte y de esta manera aparecieron en el cuadrante inferior derecho (PT-S, GT-R).

6.3 Ejemplo 3: construcción de un nuevo algoritmo

40 Este ejemplo muestra un algoritmo mejorado que correlaciona el número de mutaciones en el gen de proteasa de un VIH-1 con su susceptibilidad a tipranavir.

Se analizó un conjunto de datos de 1.411 muestras de plasma de pacientes y se identificaron las mutaciones asociadas con susceptibilidad reducida a tipranavir, como se describe en el Ejemplo 1 y 2.

45 Las muestras se agruparon tomando como base una puntuación de mutación, que se calcula sumando el número de las mutaciones asociadas con resistencia a tipranavir descritas en el estudio Kohlbrenner *et al.* Se calculó la tasa de cambio FC mediana para tipranavir las muestras en cada grupo definida por la puntuación de mutación y las muestras se agruparon tomando como base la FC para tipranavir medida siendo mayor (H) o menor (C) que la mediana para cada grupo, como se muestra en la Fig. 4. Se calculó la razón de posibilidades (OR) para cada mutación (% de las muestras H con la mutación respecto a % de las muestras L con la mutación). Se usó un ensayo Exacto de Fisher con corrección de Benjamini para comparaciones múltiples para determinar qué mutaciones en la proteasa estaban asociadas con FC para tipranavir H o L. Véase, por ejemplo, Benjamini *et al.*, 1995, *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57: 289-300.

50 Los resultados del ensayo Exacto de Fisher como se proporcionan en la Tabla 2 muestran que determinadas mutaciones, tales como las mutaciones L10I, V11L, V32I, M36L, M46I, I47V, I54A, K55R, D60E, A71L, G73T, V82T,

I84V, L89V y L90M de la proteasa de VIH-1 estaban sobre-representadas en las muestras con FC alta para tipranavir (OR > 1, valor P ajustado > 0,05). Al contrario, determinadas mutaciones, tales como L10F o V, I13V, K20R, L24I, D30N, M36I, M46L, I50L o V, I54L, L76V, V82I y N88D estaban asociadas con FC baja para tipranavir (OR < 1, valor P ajustado < 0,05).

5 Entre estas mutaciones identificadas como asociadas con susceptibilidad alterada a tipranavir, L10I, V11L, V32I, M36L, M46I, K55R, D60E, A71L, G73T, L89V y L90M y L10F, L24I, D30N, I50L o V, I54L, L76V, V82I y N88D no se usaron ni se tuvieron en cuenta para calcular la puntuación de mutación en el estudio Kohlbrenner. Además, algunas mutaciones, tales como I54A, V82T, 147V o I84V estaban altamente sobre-representadas en muestras con FC alta para tipranavir, lo que puede indicar que estas mutaciones contribuyen más significativamente a la resistencia a tipranavir que otras mutaciones. Al contrario, algunas mutaciones, tales como L24I, D30N, I50L/V, I54L, L76V y V82I están o estaban altamente sobre-representadas en muestras con FC baja para tipranavir, lo que puede indicar que estas mutaciones contribuyen a susceptibilidad incrementada a tipranavir.

15 Se formuló un algoritmo nuevo basado en la información de los resultados anteriores. Además de las veintiuna mutaciones en las dieciséis posiciones de aminoácidos en el estudio Kohlbrenner *et al.*, se incluyeron en el nuevo algoritmo dieciséis mutaciones en quince posiciones de aminoácidos que se identificaron recientemente como que estaban asociadas con susceptibilidad alterada a tipranavir. Dichas mutaciones incluyen L10I, V11L, L24I, D30N, V32I, M36L, M46I, I50L/V, I54L, A71L, G73T, L76V, V82I, L89V y L90M de la proteasa de VIH-1. Además, las mutaciones I47V, I54A, V82T y I84V de la proteasa de VIH-1 se ponderaron más alto que otras y por lo tanto se les asignó un factor de ponderación de 2; las mutaciones L101I/V, I13V, K20R, M46I/L y L90M se ponderaron más bajo que otras y por lo tanto se les asignó un factor de ponderación de 0,5; las mutaciones L24I, D30N, I50L/V, I54L, L76V y V82I se correlacionan con susceptibilidad incrementada a tipranavir y por lo tanto se les asignó un factor de ponderación de -1.

20 La Tabla 3 proporciona una lista de los factores de ponderación asignados a cada mutación. Esta tabla puede usarse para predecir si es probable que un VIH-1 sea resistente o parcialmente resistente a tipranavir. A cada una de las mutaciones de la proteasa listadas en la Tabla 3 que se detecta se le asigna un factor de ponderación según la Tabla 3. Los factores de ponderación se suman para obtener una puntuación de mutación de VIH-1. Si la puntuación de mutación es 4 o más, es probable que el VIH-1 sea resistente o parcialmente resistente al tratamiento con tipranavir (usando un corte de 2 veces) y si la puntuación de mutación es menor de 4, es probable que el VIH-1 sea sensible al tratamiento con tipranavir.

6.4 Ejemplo 4: el algoritmo nuevo y demostración de su exactitud mejorada

30 Este ejemplo demuestra que el algoritmo nuevo construido en el Ejemplo 3 tiene una proporción de discordancia reducida y exactitud mejorada sobre el algoritmo antiguo usado en el estudio Kohlbrenner.

35 Las Figs. 5-8 demuestran que la correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo nuevo tiene un coeficiente de regresión lineal mayor que el del estudio Kohlbrenner. La FC mediana para tipranavir (Log para FC) para cada grupo de muestras definida por la puntuación de mutación se representa frente a la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo antiguo (Figs. 5-6) y usando el algoritmo nuevo (Figs. 7-8). La correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo antiguo tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,51. Véanse las Figs. 5-6. La correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación calculada usando el algoritmo nuevo tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,66. Véanse las Figs. 7-8.

40 Un conjunto de datos que consiste en 1.411 muestras de pacientes se analizó genotípicamente así como fenotípicamente, como se describe en el Ejemplo 1-3. Los factores de ponderación listados en la Tabla 3 se usaron para calcular la puntuación de mutación con el algoritmo nuevo. Como se muestra en la Tabla 4, la proporción de discordancia varía dependiendo de los diferentes cortes fenotípicos y de puntuación de mutación. El corte óptimo para la puntuación de mutación se elige tomando como base una proporción baja de discordancia y distribución equilibrada de %GrPs (falsos positivos) y %GsPr (falsos negativos).

45 Cuando el corte fenotípico es 2 (FC para tipranavir > 2), tanto en el algoritmo antiguo como nuevo, el corte de la puntuación de mutación fue 4, es decir, si la puntuación de mutación para un VIH particular era 4 o mayor, el VIH era genotípicamente resistente o parcialmente resistente a tratamiento con tipranavir y si la puntuación total era menor de 4, el VIH era genotípicamente sensible a tratamiento con tipranavir. Usando un valor de corte de 4, la discordancia global usando el algoritmo nuevo (14,6%) fue menor que la del algoritmo antiguo (18,1%).

Cuando el corte fenotípico es 4 (FC para tipranavir > 4), el corte óptimo de la puntuación de mutación cambió de 5 para el algoritmo antiguo a 6 para el algoritmo nuevo. Usando el corte óptimo para la puntuación de mutación, la discordancia global usando el algoritmo nuevo (10,2%) también fue menor que la del algoritmo antiguo (13,8%).

5 Cuando el corte fenotípico es 10 (FC para tipranavir > 10), el corte óptimo de la puntuación de mutación cambió de 6 para el algoritmo antiguo a 7 para el algoritmo nuevo. Usando el corte óptimo para la puntuación de mutación, la discordancia global usando el algoritmo nuevo (7,6%) también fue menor que la del algoritmo antiguo (9,1%). Así, el algoritmo nuevo que tiene en cuenta mutaciones identificadas recientemente asociadas con susceptibilidad alterada a tipranavir y que asigna diferentes factores de ponderación a determinadas mutaciones mejora su concordancia global comparado con el algoritmo antiguo.

6.5 Ejemplo 5: aplicación del algoritmo nuevo a un conjunto de datos nuevo

En este ejemplo, se aplicó el algoritmo nuevo, determinado como se ha descrito anteriormente, a un conjunto de datos nuevo para ensayar su poder predictivo.

10 El conjunto de datos nuevo consistió en 1.845 muestras de pacientes, que contenían al menos una mutación de resistencia a inhibidor de proteasa (L23X, L24X, D30X, V32X, M46X, I47X, G48X, I50X, I54X, V82A, V82F, V82S, V82T, V82C, V82G, V82L, V82M, I84X, N88X, L90X, en los que X es cualquier aminoácido de tipo no salvaje) y contenían no más de una mezcla de residuos de aminoácidos en posiciones asociadas con susceptibilidad alterada a tipranavir listadas en la Tabla 3.

15 El conjunto de datos nuevo se analizó genotípicamente así como fenotípicamente como se describe en los Ejemplos 1-3. Se calculó una puntuación de mutación para cada muestra según el Ejemplo 3 y la Tabla 3 y se usó para predecir si el virus en las muestras sería susceptible a tipranavir con el algoritmo nuevo determinado en el Ejemplo 3. Los resultados del análisis se presentan en las Figs. 9-10 y Tabla 5.

20 Como se muestra en la Fig. 10, cuando el corte fenotípico se seleccionó para ser 2 (FC para tipranavir > 2) y se usó un corte para la puntuación de mutación de 4, la aplicación del algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo identificó el 55% de las muestras como Gs-Ps, aproximadamente el 28% de las muestras como Gr-Pr, aproximadamente el 7% de las muestras como Gr-Ps y aproximadamente el 9,3% de las muestras como Gs-Pr. La aplicación del algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo predijo correctamente el fenotipo del 83-84% de las muestras (1.540 de 1.845 muestras). La proporción de discordancia global (Gs-Pr más Gs-Pr) para el algoritmo nuevo fue 16,5%. Véase la Tabla 5.

25 De manera similar, como se muestra en la Tabla 5, cuando el corte fenotípico se seleccionó para ser 4 (FC para tipranavir > 4) y se usó un corte para la puntuación de mutación de 6, la aplicación del algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo predijo correctamente el fenotipo del 89,3% de las muestras (1.647 de 1.845 muestras). La proporción de discordancia global para el algoritmo nuevo fue 10,7%. Cuando el corte fenotípico se seleccionó para ser 10 (FC para tipranavir > 10) y se usó un corte para la puntuación de mutación de 4, la aplicación del algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo predijo correctamente el fenotipo del 92,4% de las muestras (1.708 de 1.845 muestras). La proporción de discordancia global para el algoritmo nuevo fue 7,6%.

Las proporciones de discordancia global para la aplicación del algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo usando diferentes cortes fenotípicos y genotípicos son consistentes con las de la aplicación del algoritmo nuevo al conjunto de datos de prueba (n= 1.411). Véanse las Tablas 4 y 5.

35 Además, las proporciones de discordancia global para la aplicación del algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo usando diferentes cortes fenotípicos y genotípicos son menores que las de la aplicación del algoritmo antiguo al conjunto de datos nuevo. Véase la Tabla 5. Por ejemplo, cuando el corte fenotípico es 2 y el corte para la puntuación de mutación fue 4, la proporción de discordancia global usando el algoritmo nuevo para el conjunto de datos nuevo fue 16,5% y la proporción de discordancia global usando el algoritmo antiguo para el conjunto de datos nuevo fue 20,8%.

40 Además, la Fig. 9 y Fig. 10 demuestran que la correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación cuando se aplicó el algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo tiene un coeficiente de regresión lineal mayor que el del algoritmo antiguo. La correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación cuando se aplicó el algoritmo antiguo al conjunto de datos nuevo tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,49. Véase la Fig. 9.

45 La correlación entre la tasa de cambio para tipranavir y la puntuación de mutación cuando se aplicó el algoritmo nuevo al conjunto de datos nuevo tiene un coeficiente de regresión lineal de 0,64. Véase la Fig. 10.

En resumen, estos resultados confirman que el algoritmo nuevo puede predecir la resistencia/susceptibilidad de un VIH-1 a tipranavir, tomando como base el número de mutaciones con diferente ponderación en el gen de la proteasa de un VIH-1 que se identificaron como que estaban asociadas con susceptibilidad alterada a tipranavir. Comparado con el algoritmo antiguo, el algoritmo nuevo tiene una concordancia global mayor y un coeficiente de regresión lineal mayor

50 entre el análisis fenotípico y genotípico.

6.6 Ejemplo 6: construcción de otro algoritmo a partir de un conjunto de datos mayor

Este ejemplo describe la construcción de un algoritmo adicional para predecir la resistencia o susceptibilidad a tipranavir a partir de un conjunto de datos mayor que el algoritmo de los Ejemplos 3.5.

5 En primer lugar, se generaron datos de fenotipo y genotipo de de resistencia o susceptibilidad a TPV según el Ejemplo 1. A las muestras con resistencia a TPV fuera de escala (CI_{50} para TPV mayor que la concentración de fármaco más alta ensayada en el ensayo) se les asignó un valor de tasa de cambio (FC) de 100. Los datos de fenotipo de TPV estaban disponibles para 18.647 muestras en este análisis. De éstas, 5.082 tenían al menos una mutación indicativa de exposición previa a PI, y no más de 1 mezcla de aminoácidos de tipo salvaje y mutantes en cualquier posición incluida en la puntuación de mutación para TPV calculada según el estudio Kohlbrenner, discutido en el Ejemplo 1, 10 anteriormente. Si estaban presentes datos derivados de más de una muestra del mismo paciente, sólo se incluyeron los datos más recientes. El conjunto de datos resultante contenía 4.492 puntos de datos de genotipo (PR) y fenotipo (TPV). Además, el genotipo de los 82 aminoácidos C-terminales de gag (que representa el extremo de NC/p7, así como todo p1 y p6) estaba disponible para 3.880 muestras. La mitad de las muestras (2.246 para PR y 1.940 para gag) se seleccionó aleatoriamente para servir como un conjunto de datos de prueba, actuando la otra mitad como un conjunto de datos de 15 validación.

Las muestras se agruparon tomando como base la puntuación de mutación para TPV calculada según el algoritmo de Kohlbrenner del Ejemplo 2. Se calculó la FC mediana para TPV para las muestras en cada grupo definida por la puntuación de mutación de TPV y las muestras se clasificaron adicionalmente tomando como base la FC para TPV medida siendo mayor (H, FC:proporción mediana $> 1,2$) o menor L, FC:proporción mediana $< 0,8$) que la mediana para 20 cada grupo. Se usó el ensayo Exacto de Fisher con la corrección de Benjamini para comparaciones múltiples para determinar qué mutaciones PR estaban asociadas con FC para TPV H (frente a no H) o L (frente a no L). También se calculó la razón de posibilidades (OR) para cada mutación (% de las muestras H con la mutación respecto al % de las muestras L sin la mutación).

25 Los resultados de estos cálculos se resumen en la Tabla 6 y la Figura 11. Tomando como base un corte clínico de 2 veces, la mayoría de las muestras tenían una susceptibilidad reducida a TPV cuando la puntuación de mutación para TPV calculada según el algoritmo de Kohlbrenner era 4 o mayor. Véase la Figura 11. Aunque la FC media y mediana para cada grupo de muestras se incrementó progresivamente al incrementarse la puntuación de mutación y fue evidente una correlación lineal significativa entre la FC transformada logarítmicamente y la puntuación de mutación ($R^2 = 0,50$), fue evidente una variabilidad extensa en la FC en cualquier grupo de muestras y fue mayor (%CV > 100) en las muestras con 1 a 5 mutaciones TPV. Así, en estas muestras, que tienen valores FC cercanos al umbral clínicamente relevante, la probabilidad de hacer una predicción exacta acerca de la susceptibilidad a TPV tomando como base la puntuación de mutación fue baja. Por ejemplo, entre las muestras con 3 mutaciones TPV y así consideradas sensibles por genotipo, el 44% tenía una FC para TPV mayor de 2 veces y el 19% mayor de 4 veces. Por lo tanto, estos resultados apoyan las conclusiones anteriores del Ejemplo 2 de que el algoritmo del estudio de Kohlbrenner predice de una manera pobre la 35 resistencia o susceptibilidad a TPV.

Para explorar correlatos mutacionales asociados con FC para TPV alta o baja en los grupos de muestras definidos por la puntuación de mutación para TPV calculada según el algoritmo de Kohlbrenner, la FC de cada muestra se convirtió en una proporción respecto a la FC mediana de ese grupo. La FC relativa para una mitad de las muestras seleccionada aleatoriamente se agruparon conjuntamente y se identificaron las mutaciones en PR o el extremo C-terminal de gag que 40 estaban sobre-representadas en las muestras con FC mayor (H, proporción $> 1,2$) o menor (L, proporción $< 0,8$) que la mediana usando el ensayo Exacto de Fisher con corrección para múltiples comparaciones como se ha descrito anteriormente. La Tabla 7 lista las mutaciones que mostraron asociaciones significativas con FC para TPV H o L. Se encontró que varias mutaciones ya en la puntuación de mutación para TPV estaban asociadas con FC H (I47V, I54A o M, V82T, I84V) o L (L10V, I13V, K20M o R, M36I, M46L, H69K). También se identificaron mutaciones primarias de resistencia a PI reconocidas no incluidas en la puntuación de mutación existente, incluyendo V32I, M46I, V82F, L90M (H), L24I, D30N, G48V, I50L o V, I54L y V82A). 45

Además, estaban presentes mutaciones reconocidas menos comúnmente en PR, y en gag, en números significativos de muestras con FC para TPV H o L, como se muestra en la Tabla 7. En gag, las mutaciones de interés incluyen I437V, P453L e inserciones cerca del resto PTAPP. Aunque raras (9 a 11 muestras cada una), L33LL (una inserción de leucina en la posición 33) y I85L en PR y Q430R y S498A en gag, estaban particularmente fuertemente asociadas con muestras que tenían una FC para TPV mayor de lo esperado (OR > 10). La mutación Q430R en gag está localizada en el sitio de escisión p7NC/p1 y se ha reportado previamente que aparece en VIH resistente a PI. 50

Además, el poder de predicción de la proporción de muestras con una mutación dada se ensayó en un árbol de regresión (véase la Figura 12A-C) y un árbol de clasificación (véase la Figura 13A-B) usando software CART 5.0 (Salford Systems, San Diego CA). Estos procedimientos ayudan a identificar variables dicotómicas o continuas con la mayor 55

capacidad de separar muestras en dos grupos tomando como base la FC para TPV. Por ejemplo, para el árbol de regresión, la presencia de I84V fue la variable que actuó como mejor separador en este análisis, seguida de I47V y I13V (véase la Figura 12A-C). Para el árbol de clasificación, la presencia de I84V fue la variable que actuó como mejor separador en este análisis, seguida de I47V y M36I (Véase la Figura 13A-B). Los resultados de los análisis de clasificación y regresión también se resumen en la Tabla 8, más adelante.

Tomando como base los descubrimientos descritos anteriormente, se construyó un algoritmo ajustado para evaluar la resistencia o susceptibilidad a TPV seleccionando las mutaciones con las asociaciones significativas más fuertes y ajustando la puntuación asignada a ellas. Las ponderaciones asignadas a mutaciones particulares se resumen en la Tabla 9, más adelante. Brevemente, a las mutaciones I47V, I54A, I54M, V82T, I84V se les proporcionó una puntuación de 2 a cada una y a las mutaciones L10V, I13V, K20R, M46L se les asignó una puntuación de 0,5. Además, se añadió a las mutaciones una puntuación de 1 (V11L, K20M/V, V32I, L33F, E35G, M36I, M36L, K43T, I54M/V, Q58E, H69K, A71L, G73T, T74P, V82L, N83D, L89V en la proteasa y I437V en gag), 0,5 (L10I, M46I, L90M) ó -1 (L24I, D30N, G48V, I50L/V, I54L, L76V, V82I), dependiendo de la fuerza de la asociación. En algunos casos, las mutaciones no se incluyeron debido a la posibilidad de ligación fuerte a otras mutaciones en la nueva puntuación, tal como N88D (encontrada frecuentemente en muestras con D30N) y I85V (encontrada frecuentemente con I84V o L90M).

El rendimiento del algoritmo ajustado para TPV se ensayó usando el conjunto de datos usado para derivar puntuación de mutación ajustada así como la segunda mitad del conjunto de datos de partida (datos de validación) comparando los coeficientes de correlación derivados de los gráficos de dispersión mostrados en la Figura 11 (calculado usando el algoritmo de Kohlbrenner) y en la Figura 14 (calculado usando el algoritmo ajustado para TPV) y las proporciones de discordancia fenotipo-genotipo usando una valor de FC de 2,0 para definir la susceptibilidad fenotípica (Tabla 10). Tomando como base los gráficos de dispersión mostrados en las Figuras 11 y 12, la correlación entre la FC para TPV y la puntuación de mutación se mejoró significativamente, de 0,50 a 0,64.

El rendimiento del algoritmo antiguo de Kohlbrenner y el algoritmo ajustado presentado en la Tabla 9 se muestra en las Tablas 10-16. La Tabla 10 muestra la concordancia de fenotipo determinado empíricamente del conjunto de datos de prueba con el fenotipo predicho por el algoritmo antiguo como 77,6%. La Tabla 11 ordena el conjunto de datos de prueba por puntuación de mutación calculada por el algoritmo ajustado, mientras la Tabla 12 muestra la concordancia del fenotipo observado con el genotipo predicho como 81,7%.

Las Tablas 13-16 aplican los algoritmos antiguo y ajustado al conjunto de datos de validación. Como se muestra en la Tabla 14, la concordancia global para fenotipo predicho frente a observado para el algoritmo antiguo fue 78,2% mientras que la concordancia correspondiente para el algoritmo ajustado fue 83,3%.

TABLA 1

Puntuación de Mutación

PUNTUACIÓN DE MUTACIÓN PARA TPV									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8-9
RECuento	202	308	242	218	187	119	81	32	22
MEDIA	0,8	1,0	1,5	3,1	6,1	11	16	32	44
MEDIANA	0,7	0,8	1,1	1,6	3,0	5,7	8,8	12	24
SD	0,4	0,6	2,7	7,2	13	19	25	38	40
%CV	45%	65%	175%	233%	210%	165%	152%	116%	91%

TABLA 2
Resultados del Ensayo Exacto de Fisher

mutación	n mut	OR=H/L	Valor P
I54A	16	15,1	0,00253
A71L	18	8,0	0,00497
V11L	20	4,0	0,03667
V82T	65	2,8	0,00076
I47V	122	2,8	<0,00001
I47	133	2,7	<0,00001
G73T	66	2,5	0,00329
L89V	105	2,3	0,00034
I84V	356	2,2	<0,00001
I84	361	2,2	<0,00001
V32	175	2,0	0,00006
V32I	169	2,0	0,00008
M36L	77	2,0	0,02024
I66	94	1,9	0,01722
L89	186	1,7	0,00272
D60E	217	1,6	0,00265
K55	188	1,6	0,00680
K55R	169	1,6	0,01546
D60	234	1,5	0,00701
L90M	787	1,3	<0,00001
L90	793	1,3	<0,00001
M46I	495	1,3	0,00424
L10I	625	1,2	0,02199
I13	577	0,8	0,03217
M36I	549	0,8	0,03953
I13V	564	0,8	0,01566
L10F	281	0,7	0,01981
K20R	234	0,7	0,04161
L89	186	1,7	0,00272

ES 2 428 563 T3

mutación	n mut	R/S	Valor P
D60E	217	1,6	0,00265
K55	188	1,6	0,00680
K55R	169	1,6	0,01546
D60	234	1,5	0,00701
L90M	787	1,3	<0,00001
L90	793	1,3	<0,00001
M46I	495	1,3	0,00424
L10I	625	1,2	0,02199
I13	577	0,8	0,03217
L10V	145	0,7	0,04127
M46L	201	0,6	0,00259
N88	187	0,5	0,00007
I54L	133	0,5	0,00063
N88D	153	0,5	0,00005
V82I	46	0,4	0,04848
L24	118	0,4	0,00004
I50L	34	0,4	0,04168
L76	49	0,3	0,00316
L76V	49	0,3	0,00303
L24I	93	0,3	<0,00001
D30	142	0,2	<0,00001
D30N	134	0,2	<0,00001
L50	90	0,2	<0,00001
I50V	53	0,1	<0,00001

TABLA 3

Factores de Ponderación

Mutación	Factor de Ponderación	Mutación	Factor de Ponderación
L10I/V	0,5	I54A	2
V11L	1	I54M/V	1
I13V	0,5	I54L	-1
K20M/V	1	Q58E	1
K20R	0,5	H69K	1
L24I	-1	A71L	1
D30N	-1	G73T	1
V32I	1	T74P	1
L33F	1	L76V	-1
E35G	1	V82I	-1
M36I	1	V82T	2
M36L	1	V82L	1
K43T	1	N83D	1
M46I/L	0,5	I84V	2
I47V	2	L89V	1
I50L/V	-1	L90M	0,5

TABLA 4

Proporción de Discordancia para la Aplicación del Algoritmo Antiguo y Nuevo al Conjunto de Datos de Prueba

Corte de Fenotipo	2					
Corte de puntuación de mutación	3	4	5	3	4	5
Puntuación	Antiguo			Nuevo		
GsPs	692	822	891	700	809	887
GrPr	422	334	216	441	396	333
GrPs	237	107	38	229	120	42
GsPr	60	148	266	41	86	149
% GrPs	16,8%	7,6%	2,7%	16,2%	8,5%	3,0%
% GsPr	4,3%	10,5%	18,9%	2,9%	6,1%	10,6%
% disc	21,0%	18,1%	21,5%	19,1%	14,6%	13,5%

Corte de Fenotipo	4					
Corte de puntuación de mutación	4	5	6	4	5	6
Puntuación	Antiguo			Nuevo		
GsPs	922	1.033	1.081	878	991	1.054
GrPr	259	183	112	290	262	213
GrPs	182	71	23	226	113	50
GsPr	48	124	195	17	45	94
% GrPs	12,9%	5,0%	1,6%	16,0%	8,0%	3,5%
% GsPr	3,4%	8,8%	13,8%	1,2%	3,2%	6,7%
% disc	16,3%	13,8%	15,5%	17,2%	11,2%	10,2%

ES 2 428 563 T3

Corte de Fenotipo	10					
Corte de puntuación de mutación	6	7	8	6	7	8
Puntuación	Antiguo			Nuevo		
GsPs	1.207	1.254	1.264	1.128	1.204	1.240
GrPr	75	41	19	124	100	66
GrPs	60	13	3	139	63	27
GsPr	69	103	125	20	44	78
% GrPs	4,3%	0,9%	0,2%	9,9%	4,5%	1,9%
% GsPr	4,9%	7,3%	8,9%	1,4%	3,1%	5,5%
% disc	9,1%	8,2%	9,1%	11,3%	7,6%	7,4%

TABLA 5

Proporción de Discordancia para la Aplicación del Algoritmo Antigo y Nuevo al Conjunto de Datos de Prueba (n= 1.845)

Corte de Fenotipo	2					
Corte de puntuación de mutación	3	4	5	3	4	5
Puntuación	Antigo			Nuevo		
GsPs	865	1.022	1.110	888	1.022	1.101
GrPr	579	440	277	620	518	404
GrPs	290	133	45	267	133	54
GsPr	111	250	413	70	172	286
% GrPs	15,7%	7,2%	2,4%	14,5%	7,2%	2,9%
% GsPr	6,0%	13,6%	22,4%	3,8%	9,3%	15,5%
% disc	21,7%	20,8%	24,8%	18,3%	16,5%	18,4%

Corte de Fenotipo	4					
Corte de puntuación de mutación	4	5	6	4	5	6
Puntuación	Antigo			Nuevo		
GsPs	1.195	1.341	1.404	1.153	1.300	1.379
GrPr	341	236	131	377	331	268
GrPs	232	86	23	274	127	48
GsPr	77	182	287	41	87	150
% GrPs	12,6%	4,7%	1,2%	14,9%	6,9%	2,6%
% GsPr	4,2%	9,9%	15,6%	2,2%	4,7%	8,1%
% disc	16,7%	14,5%	16,8%	17,1%	11,6%	10,7%

ES 2 428 563 T3

Corte de Fenotipo	10					
Corte de puntuación de mutación	6	7	8	6	7	8
Puntuación	Antiguo			Nuevo		
GsPs	1.590	1.626	1.641	1.496	1.583	1.627
GrPr	97	51	22	165	125	88
GrPs	57	21	6	151	64	20
GsPr	101	147	176	33	73	110
% GrPs	3,1%	1,1%	0,3%	8,2%	3,5%	1,1%
% GsPr	5,5%	8,0%	9,5%	1,8%	4,0%	6,0%
% disc	8,6%	9,1%	9,9%	10,0%	7,4%	7,0%

TABLA 6

Puntuación de Mutación para TPV										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
recuento	439	888	793	781	661	443	290	118	62	17
FC Media	0,8	1,1	1,6	3,1	5,8	10	17	24	30	42
FC Mediana	0,7	0,9	1,1	1,7	2,9	5,5	10,7	16	31	53
SD	0,4	2,0	2,0	4,6	9	12	16	19	20	14
%CV	55%	173%	124%	150%	148%	123%	99%	82%	66%	34%

TABLA 7

proteína	mutación	n mut	% mut H ^a	% mut L ^b	OR ^c	valor p
gag	S498A	11	1,4%	0,1%	15,93	0,01039
PR	L33LL ^d	10	1,0%	0,1%	13,92	0,02207
gag	Q430R	9	1,1%	0,1%	12,74	0,04352
PR	I85L	9	0,9%	0,1%	12,37	0,04434
PR	L10R	12	1,1%	0,1%	7,73	0,03471
PR	A71L	20	1,8%	0,3%	6,19	0,00554
PR	K55N	25	2,3%	0,4%	6,19	0,00099
PR	E34D	30	2,6%	0,5%	5,08	0,00099
PR	V82F	41	3,5%	0,7%	4,79	<0,0001
PR	I54A ^e	26	2,2%	0,5%	4,20	0,01451
gag	Q500K	25	2,4%	0,6%	4,10	0,01367
gag	A431I	32	3,1%	0,8%	4,07	0,00345
PR	V11L	48	3,7%	1,1%	3,40	0,00099
PR	G73T	120	9,0%	3,0%	2,98	<0,0001
PR	V82T ^e	139	10%	3,7%	2,75	<0,0001
PR	I47V ^e	235	16%	7,1%	2,20	<0,0001
PR	I84V ^e	633	41%	20%	2,09	<0,0001
PR	I54M ^e	167	11%	5,2%	2,09	<0,0001
PR	V32I	291	18%	9,6%	1,89	<0,0001
PR	I85V	187	12%	6,2%	1,86	0,00035
gag	P453ins	104	7,4%	4,2%	1,79	0,04134
PR	M46I	874	50%	32%	1,55	<0,0001
gag	I437V	257	17%	11%	1,48	0,01367
PR	K55R	333	18%	13%	1,40	0,01749
gag	P453L	582	35%	28%	1,27	0,01367
PR	L90M	1.304	67%	53%	1,27	<0,0001
PR	L10I	1.052	52%	43%	1,21	0,00099
PR	I13V ^e	933	38%	47%	0,80	0,00018
PR	M36I ^e	926	37%	48%	0,78	<0,0001
PR	L10F	463	18%	24%	0,76	0,01813
PR	V82A	775	30%	41%	0,74	<0,0001

ES 2 428 563 T3

proteína	mutación	n mut	% mut H ^a	% mut L ^b	OR ^c	valor p
gag	S498L	235	10%	15%	0,66	0,01602
PR	K20R ^e	451	16%	27%	0,59	<0,0001
PR	M46L ^e	355	12%	21%	0,59	<0,0001
PR	L10V ^e	273	9,5%	16%	0,59	0,00010
PR	N88D	271	9,5%	16%	0,59	0,00010
PR	K54R	108	3,6%	6,7%	0,55	0,02813
PR	V82I	94	3,1%	6,0%	0,51	0,02114
PR	I54L	239	7,6%	15%	0,50	<0,0001
PR	L76V	75	2,3%	5,0%	0,45	0,00970
PR	L23I	63	1,8%	4,4%	0,42	0,01204
PR	D30N	264	7,6%	18%	0,41	<0,0001
PR	K20M ^e	78	2,2%	5,5%	0,40	0,00119
PR	G48V	111	2,9%	8,1%	0,36	<0,0001
PR	H69K ^e	34	0,9%	2,5%	0,35	0,03889
PR	L24I	185	4,7%	14%	0,34	<0,0001
PR	I50L	75	1,7%	6,0%	0,28	<0,0001
PR	I50V	83	1,0%	7,9%	0,13	<0,0001

TABLA 8
IMPORTANCIA DE LAS MUTACIONES

MUTACIÓN	+ o -	REGRESIÓN	CLASIFICACIÓN
I84V	+	100,00	100,00
I47V	+	50,46	51,02
V32I	+	36,56	43,48
I54M	+	34,24	32,84
M36I	+	25,28	6,20
V82T	+	24,25	8,75
V11L	+	23,53	10,13
I13V	+	21,83	4,01
K20R	+	14,94	18,32
I437V	+	14,78	9,32
M46L	+	13,17	6,53
L10F	-	11,19	2,86
A431I	+	10,70	5,81
D30N	-	10,35	6,88
L90M	+	10,00	9,61
I54A	+	9,73	3,52
A71V	+/-	8,45	12,57
G73T	+	7,77	5,11
I50V	-	7,52	2,23
A71L	+	6,83	3,24
N88D	+	6,38	2,98
L10I	+	6,07	3,65
I54L	-	5,59	4,08
I85L	+	5,57	0,00
K55N	+	5,13	0,00
V82A	+	5,05	4,49
L10V	+	4,87	0,00
Q430R	+	4,38	0,00
L24I	-	4,17	3,76
G48V	-	4,01	1,66

ES 2 428 563 T3

MUTACIÓN	+ o -	REGRESIÓN	CLASIFICACIÓN
V82F	+	3,87	0,00
I85V	+	3,54	0,00
K55R	+	3,27	3,90
M46I	+	3,17	6,01
P453L	+/-	2,95	9,90
S498L	+	2,38	0,53
L76V	-	2,08	0,05
P453INS	+	1,97	3,22
K45R	+	1,77	1,29
V82I	-	1,62	0,57
Q500K	+	1,18	0,00
L23I	+	1,16	0,00
E34D	+	1,07	0,00
I50L	-	0,98	0,05
L10R	+	0,75	0,00
H69K	+	0,53	0,00
S498A	+	0,46	0,00
K20M	+	0,27	0,05
L33LL	+	0,01	0,00

TABLA 9

Factores de Ponderación

Mutación	Factor de Ponderación	Mutación	Factor de ponderación
L10I/V	0,5	I54A	2
V11L	1	I54V	1
I13V	0,5	I54M	2
K20M/V	1	I54L	-1
K20R	0,5	Q58E	1
L24I	-1	H69K	1
D30N	-1	A71L	1
V32I	1	G73T	1
L33F	1	T74P	1
E35G	1	L76V	-1
M36I	1	V82I	-1
M36L	1	V82T	2
K43T	1	V82L	1
M46I/L	0,5	N83D	1
I47V	2	I84V	2
G48V	-1	L89V	1
I50L/V	-1	L90M	0,5
gag I437V	1		

TABLA 10

Concordancia para la puntuación de mutación antigua, datos de prueba (n= 2.246)

GRUPO	FC TPV	PUNTUACIÓN MTN	N	%
PR,GR	> 2	≥ 4	602	26,8%
PR,GS	> 2	< 4	318	14,2%
PS,GR	< 2	≥ 4	186	8,3%
PS,GS	< 2	< 4	1.140	50,8%

(concordancia global: 77,6%)

TABLA 11

5 Puntuación de Mutación Ajustada, datos de prueba con gag (n= 1.916)

	Puntuación de Mutación TPV									
	< 3	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	≥7
recuento	876	125	116	129	109	81	71	81	49	279
media	1,1	2,3	3,2	2,5	3,1	4,0	5,1	7,2	10,0	19,7
mediana	0,9	1,5	1,5	2,0	2,2	2,8	2,4	4,9	6,3	13,4
SD	1,0	4,8	6,6	2,3	3,0	3,4	7,7	8,6	12,0	17,2
%CV	94%	207%	206%	89%	98%	84%	152%	119%	120%	87%

TABLA 12

Concordancia para la puntuación de mutación calculada con el algoritmo ajustado, datos de prueba con gag

GRUPO	FC TPV	PUNTUACIÓN MTN	N	%
PR,GR	> 2	≥ 4	605	31,6%
PR,GS	> 2	< 4	158	8,2%
PS,GR	< 2	≥ 4	194	10,1%
PS,GS	< 2	< 4	959	50,1%

(concordancia global: 81,7%)

TABLA 13

Puntuación de mutación básica, datos de validación (n= 2.246)

	Puntuación de Mutación TPV									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
recuento	221	451	418	384	342	227	117	55	29	2
media	0,8	1,1	1,7	3,4	6,4	10,7	18	24	31	41
mediana	0,7	0,9	1,2	1,8	3,2	5,7	11,7	19	33	41
SD	0,5	1,8	2,2	4,4	9,5	13	17	20	20	18
%CV	57%	155%	126%	133%	149%	121%	95%	81%	65%	43%

TABLA 14

5 Concordancia para la puntuación de mutación antigua, datos de validación (n= 2.246)

GRUPO	FC TPV	PUNTUACIÓN MTN	n	%
PR,GR	> 2	≥ 4	597	26,6%
PR,GS	> 2	< 4	314	14,0%
PS,GR	< 2	≥ 4	175	7,8%
PS,GS	< 2	< 4	1.160	51,6%

(concordancia global: 78,2%)

TABLA 15

Puntuación de Mutación Ajustada, datos de validación con gag (n= 1.916)

	Puntuación de Mutación TPV									
	< 3	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	>=7
recuento	849	129	112	115	95	89	96	101	66	264
media	1,1	1,8	2,3	2,6	3,5	4,4	5,2	8,6	12,6	20,1
mediana	0,9	1,4	1,5	2,0	2,4	2,8	3,2	4,5	7,4	12,5
SD	0,9	1,9	2,9	2,0	4,1	6,1	6,6	10,4	11,4	17,5
%CV	87%	103%	123%	76%	116%	139%	127%	121%	90%	87%

TABLA 16

Concordancia para la puntuación de mutación calculada con el algoritmo ajustado, datos de validación con gag

GRUPO	FC TPV	PUNTUACIÓN MTN	N	%
PR,GR	> 2	≥ 4	641	33,5%
PR,GS	> 2	< 4	136	7,1%
PS,GR	< 2	≥ 4	185	9,7%
PS,GS	< 2	< 4	954	49,8%

(concordancia global: 83,3%)

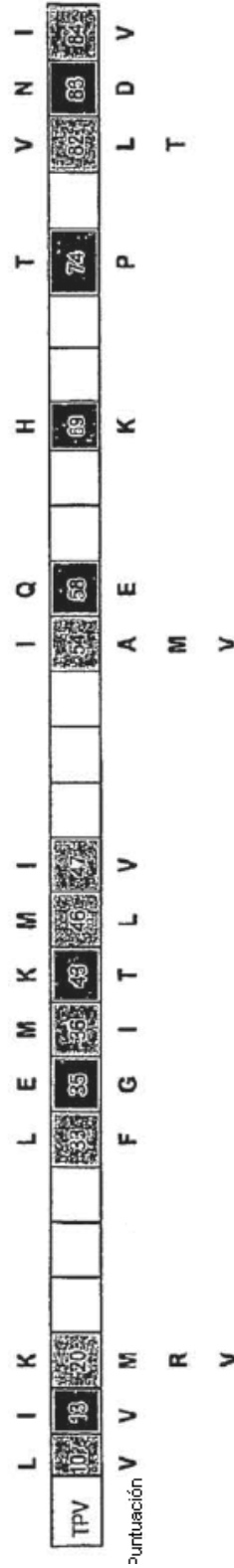
REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si es probable que un virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) tenga una susceptibilidad reducida a tipranavir, que comprende:
- 5 (a) detectar, en un gen que codifica una proteasa del VIH-1, la presencia o ausencia de mutaciones en la proteasa de VIH-1, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación; y
- (b) sumar los factores de ponderación para cada una de las mutaciones que se detectan en la etapa (a) para calcular una puntuación de mutación para el VIH-1;
- en el que el método se caracteriza por
- 10 detectar la presencia o ausencia de las mutaciones en la proteasa de VIH-1 listadas en la Tabla 3 ó 9; estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 3 ó 9;
- en el que es probable que el VIH-1 tenga una susceptibilidad reducida a tipranavir si dicha puntuación de mutación es igual a o mayor de 4;
- en el que el VIH-1 es un VIH-1 de una muestra de un paciente.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el VIH-1 es un VIH-1 aislado de una muestra de un paciente.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que es probable que el VIH-1 tenga una susceptibilidad reducida a tipranavir si dicha puntuación de mutación es igual a o mayor de 5, igual a o mayor de 6 o igual a o mayor de 7.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el VIH-1 se aísla de la muestra del paciente sin propagación en cultivo celular.
- 20 5. Un método implementado por ordenador para determinar si es probable que un VIH-1 tenga una susceptibilidad reducida a tipranavir, que comprende:
- (a) introducir en un medio legible por ordenador datos genotípicos de una proteasa de VIH-1 del VIH-1;
- (b) comparar los datos genotípicos con una base de datos que comprende el conjunto de mutaciones listado en la Tabla 3 ó 9, estando asociada cada una de dichas mutaciones con un factor de ponderación como se muestra en la Tabla 3 ó 9; y
- 25 (c) calcular una puntuación de mutación sumando los factores de ponderación asociados con la o las mutaciones presentes en el genotipo del VIH-1;
- en el que si la puntuación de mutación es igual a o mayor de 4, se determina que el VIH-1 tiene una susceptibilidad reducida a tipranavir.
- 30 6. Un medio legible por ordenador que comprende un programa de ordenador que determina si es probable que un VIH-1 que infecta a un sujeto tenga una susceptibilidad reducida a tipranavir, que comprende:
- (a) un código de ordenador que recibe la entrada correspondiente a un genotipo de un ácido nucleico de VIH-1 que codifica la proteasa de VIH-1 obtenido el VIH-1 que infecta al sujeto;
- (b) un código de ordenador que lleva a cabo una comparación para determinar si las mutaciones listadas en la Tabla 3 ó 9 están presentes o ausentes;
- 35 (c) un código de ordenador que calcula una puntuación de mutación basada en el número de mutaciones presentes;
- (d) un código de ordenador que determina si la puntuación de mutación es igual a o mayor de una puntuación de corte, en el que se determina que el VIH-1 tiene una susceptibilidad reducida a tipranavir si la puntuación de mutación es igual a o mayor de 4; y
- 40 (e) un código de ordenador que transmite un resultado que representa si se determina que VIH-1 tiene o no una susceptibilidad reducida a tipranavir a un dispositivo de salida.
7. El medio legible por ordenador de la reivindicación 6, en el que el medio se selecciona del grupo que comprende un disquete, CD, DVD, cinta magnética y unidad de disco fijo.

FIG. 1 Mutaciones Asociadas a Resistencia a TPV

- 21 mutaciones en 16 loci de aminoácidos asociadas con susceptibilidad reducida a TPV o respuesta reducida en Kohlbrener *et al.*

– 10V, 13V, 20M/R/V, 33F, 35G, 36I, 43T, 46L, 47V, 54A/M/V, 58E, 69K, 74P, 82L/T, 83D, and 84V



- Muchas mutaciones (13, 35, 43, 58, 74, 83) no se han asociado con resistencia a otros PI
- Las mutaciones principales (D30N, G48V, N88D, L90M) asociadas con otros PI no contribuyen a la puntuación de mutación de TPV

FIG.2 Rendimiento en la Puntuación de Mutación de Tipranavir

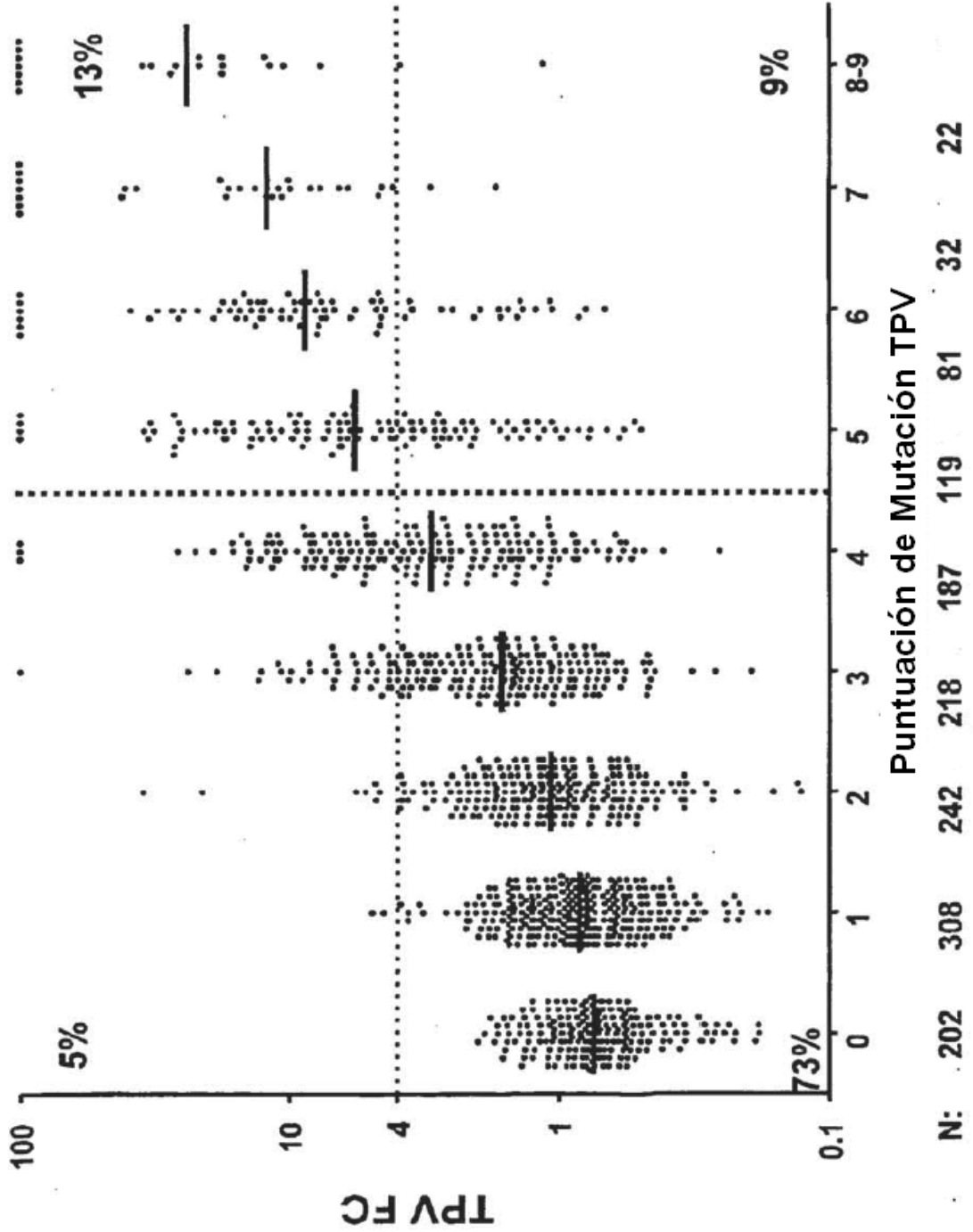


FIG.3 Rendimiento en la Puntuación de Mutación de Tipranavir

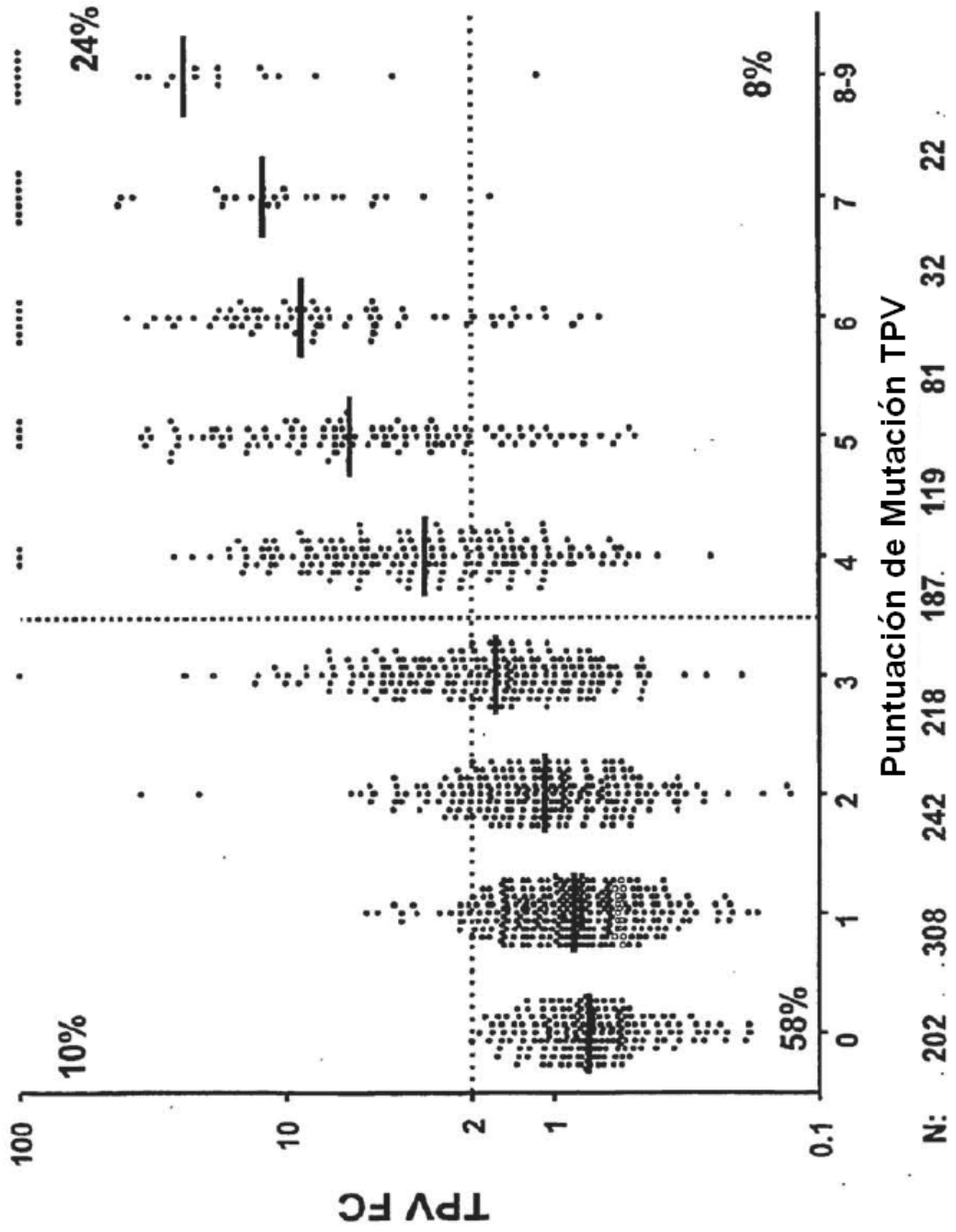


FIG.4 Rendimiento en la Puntuación de Mutación de Tipranavir

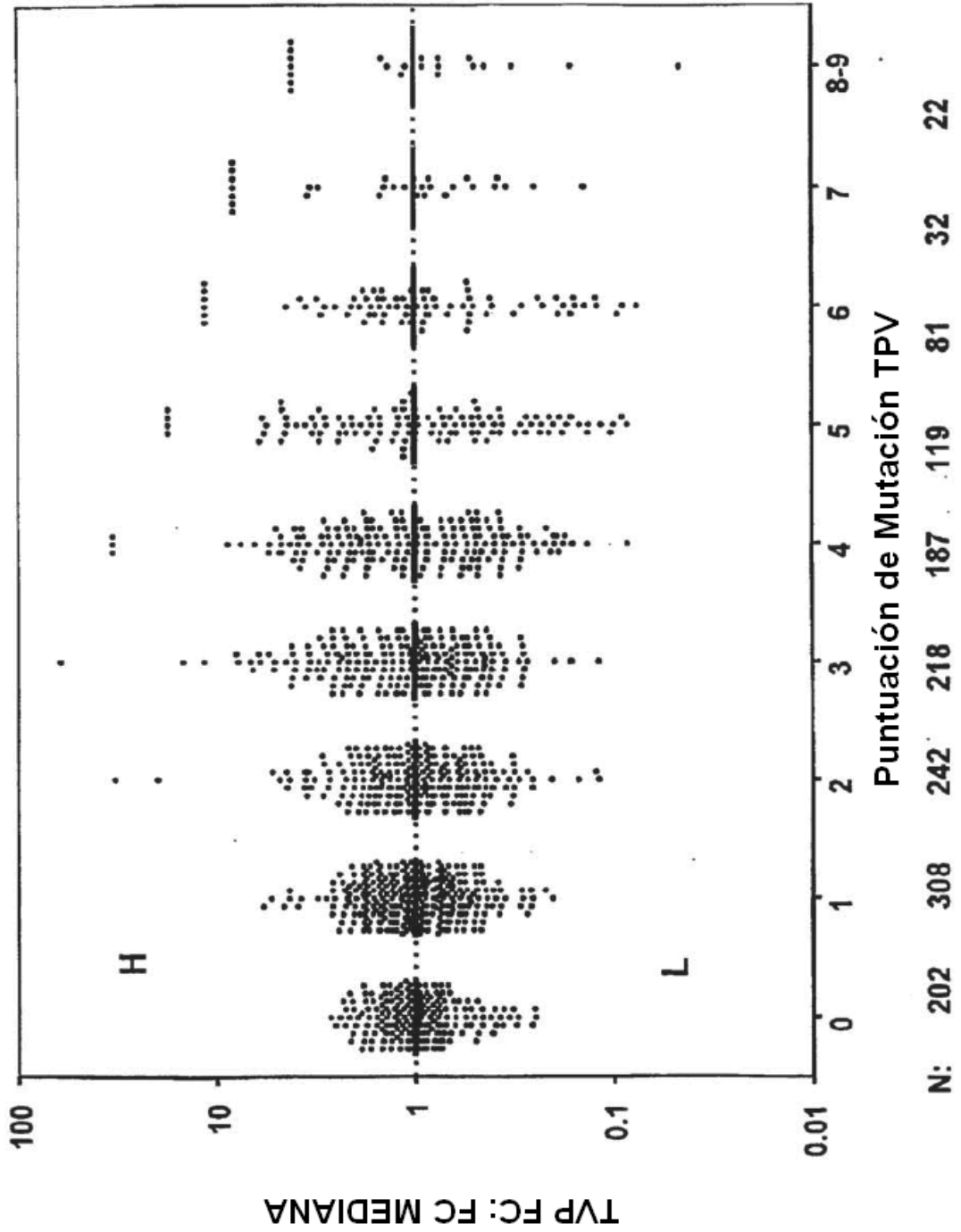


FIG. 5 Puntuación de Mutación TPV Original

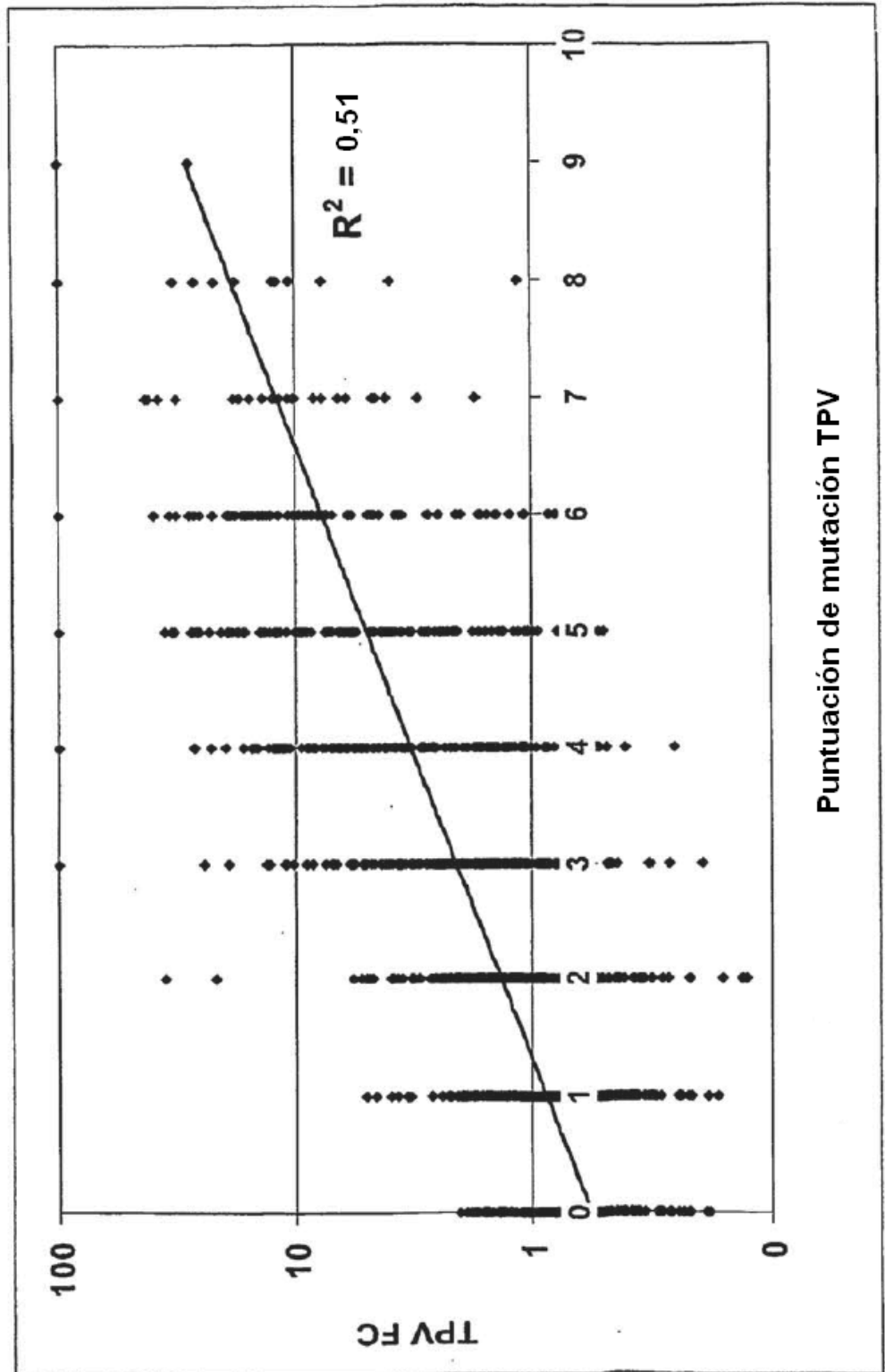


FIG. 6 Rendimiento en la Puntuación de Mutación de Tipranavir

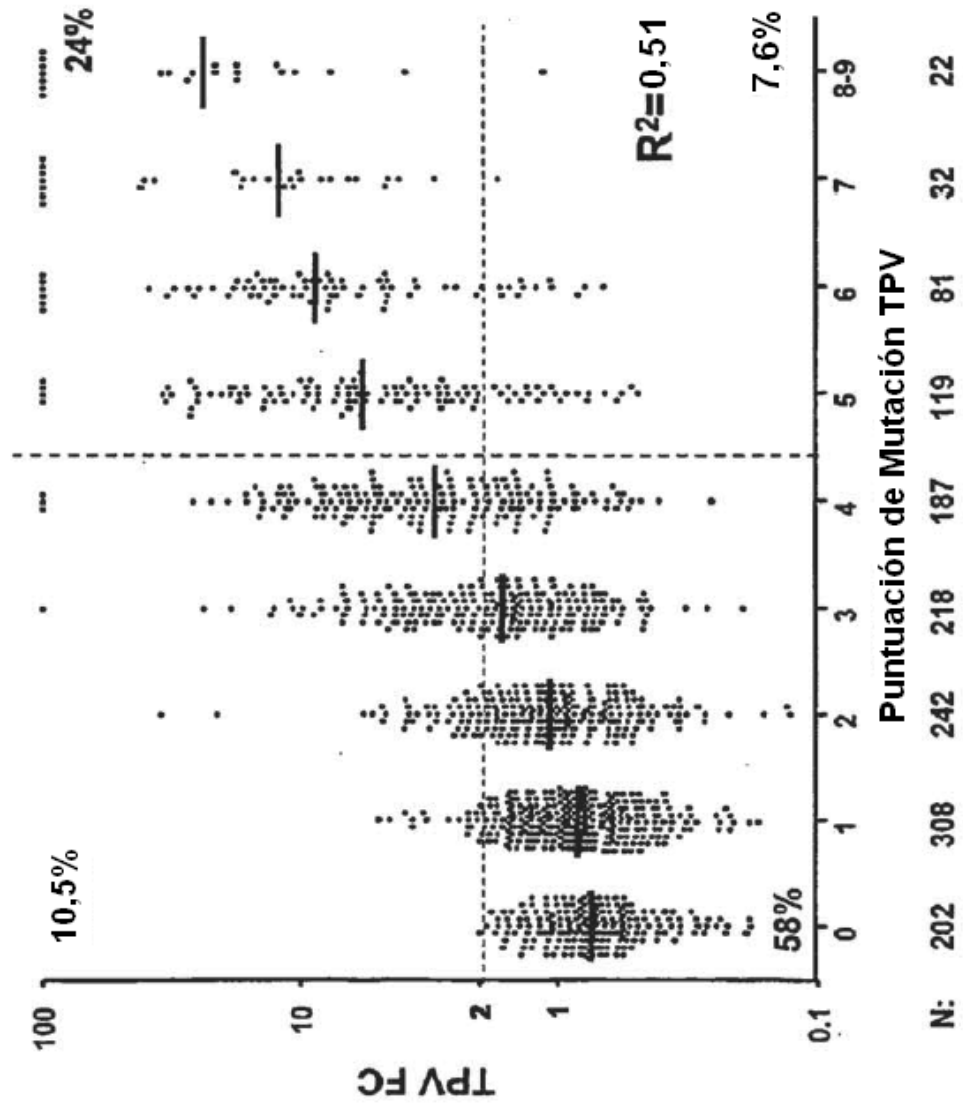


FIG. 7 Nueva Puntuación de Mutación TPV

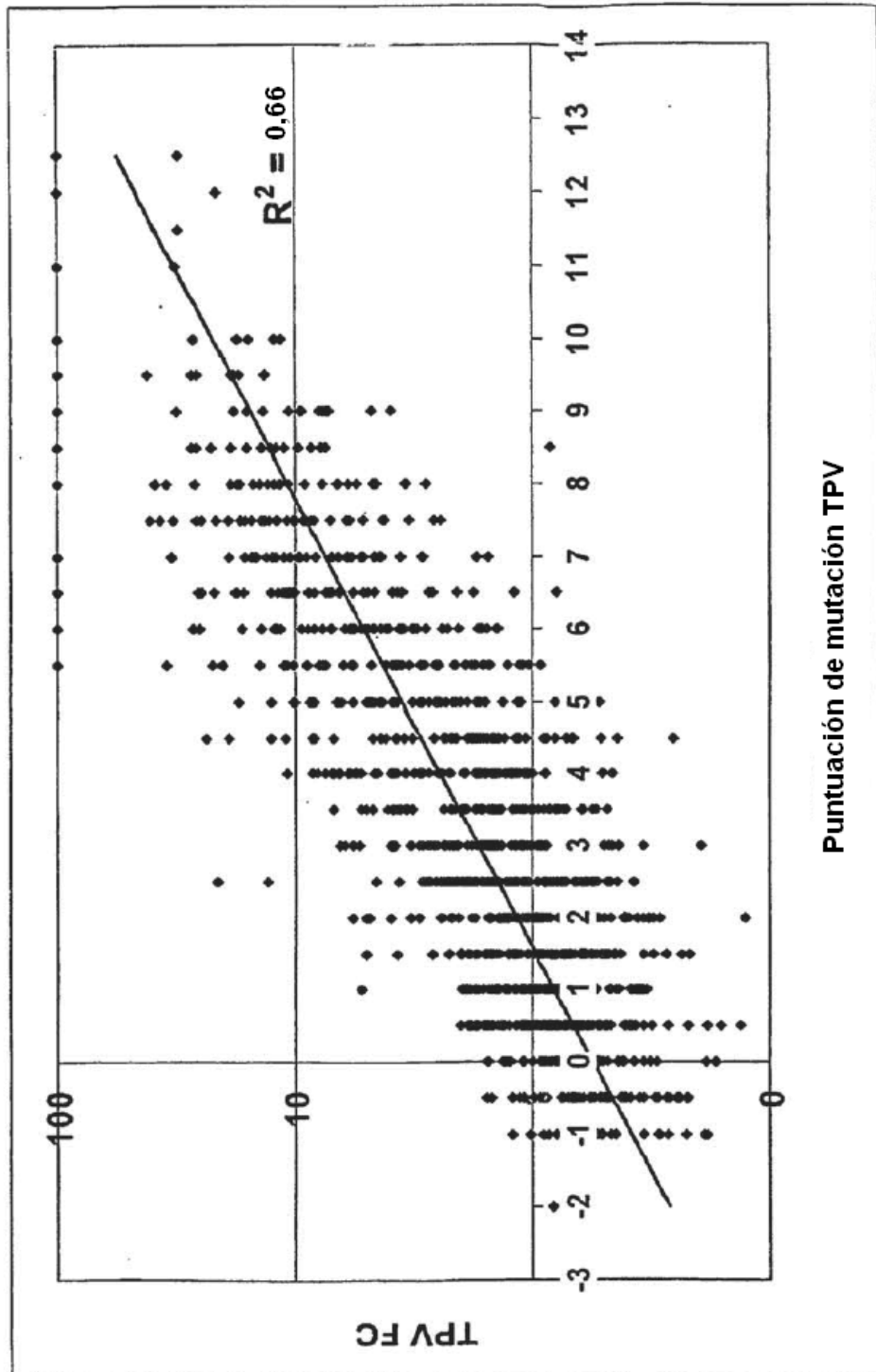


FIG. 8 Rendimiento de la Nueva Puntuación de Mutación TPV

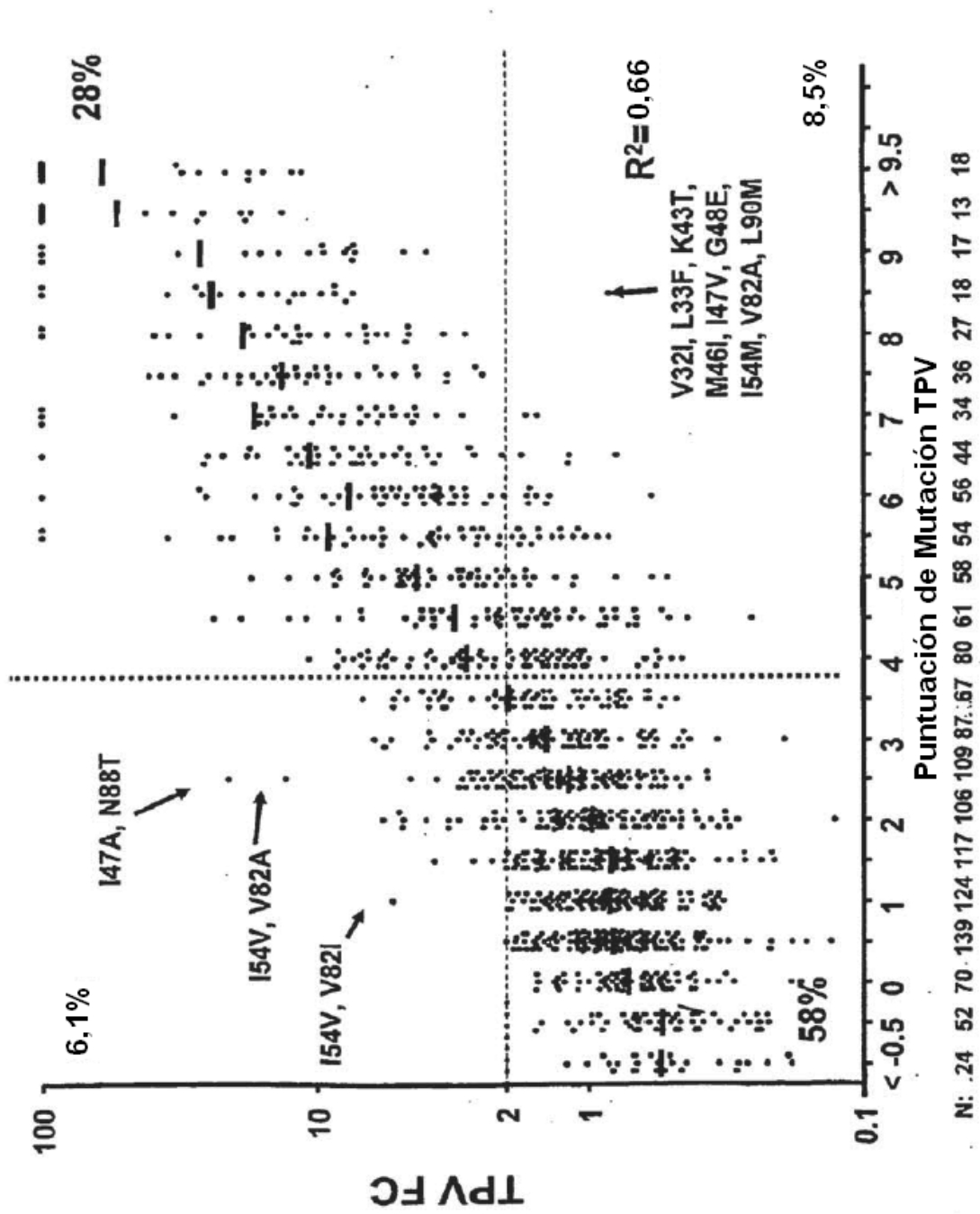


FIG. 9 Rendimiento de la Puntuación de Mutación de Tipirnavir (Datos de Validación)

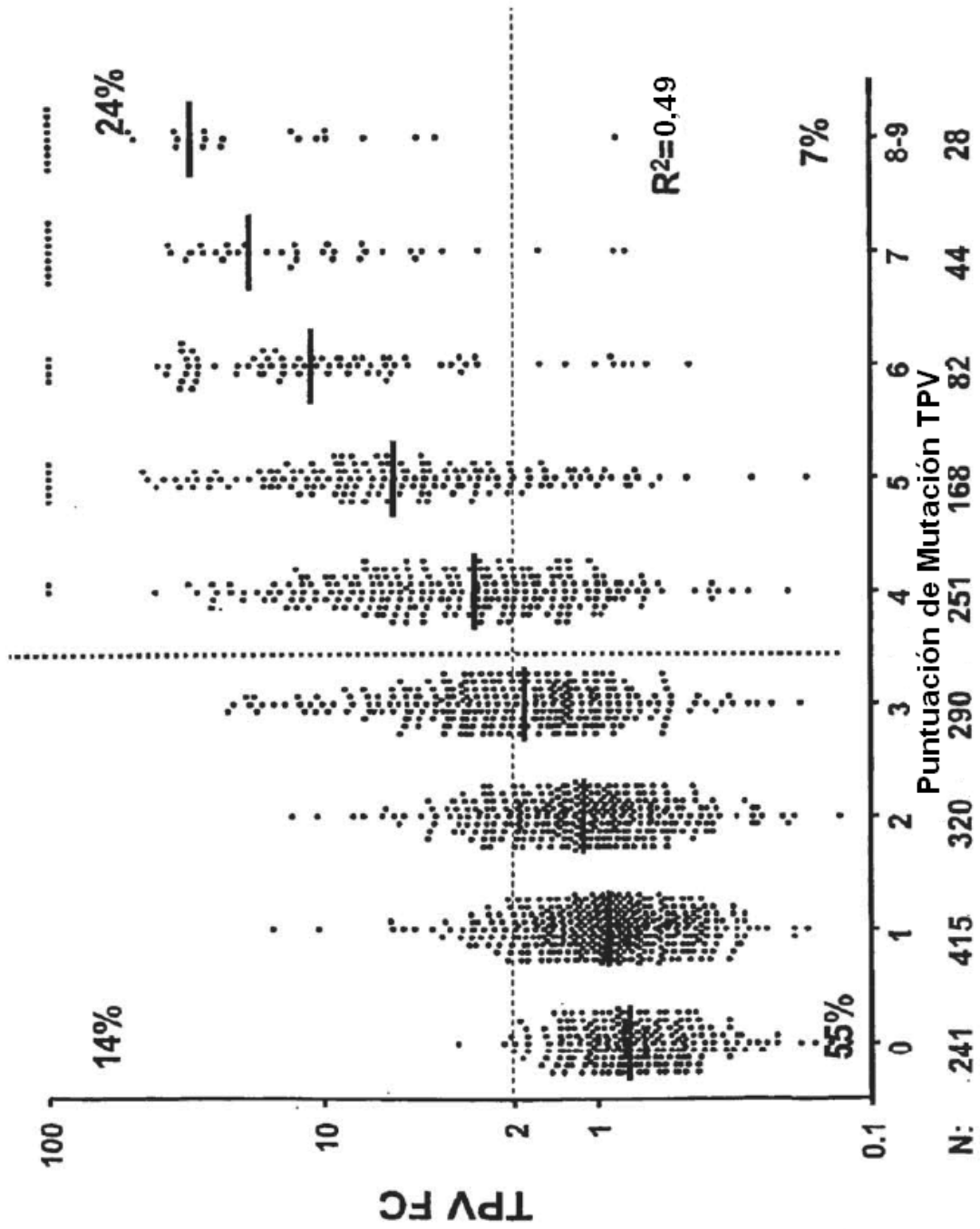


FIG. 10 Rendimiento de la Nueva Puntuación de Mutación de Tipranavir (Datos de Validación)

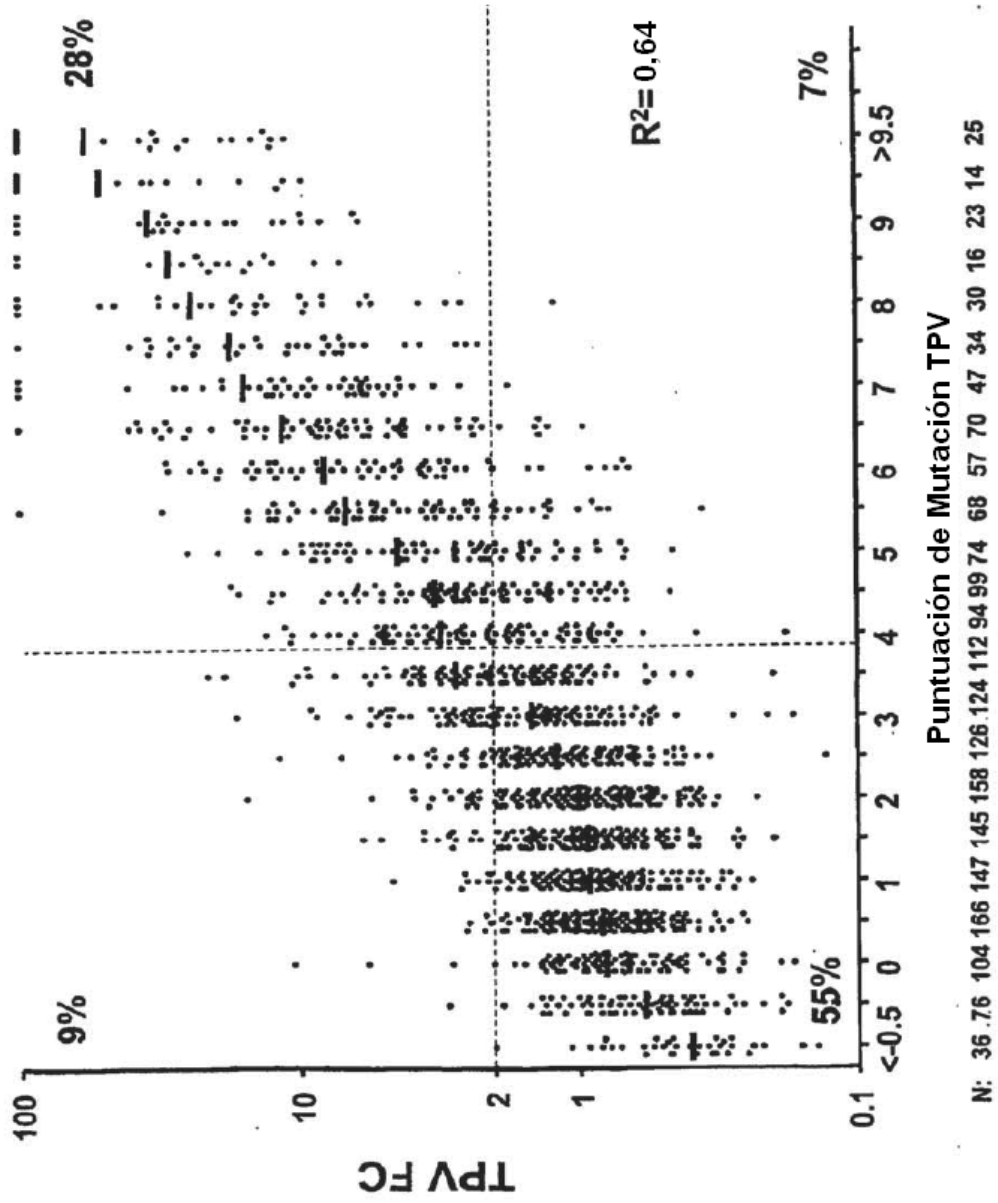


FIG.11

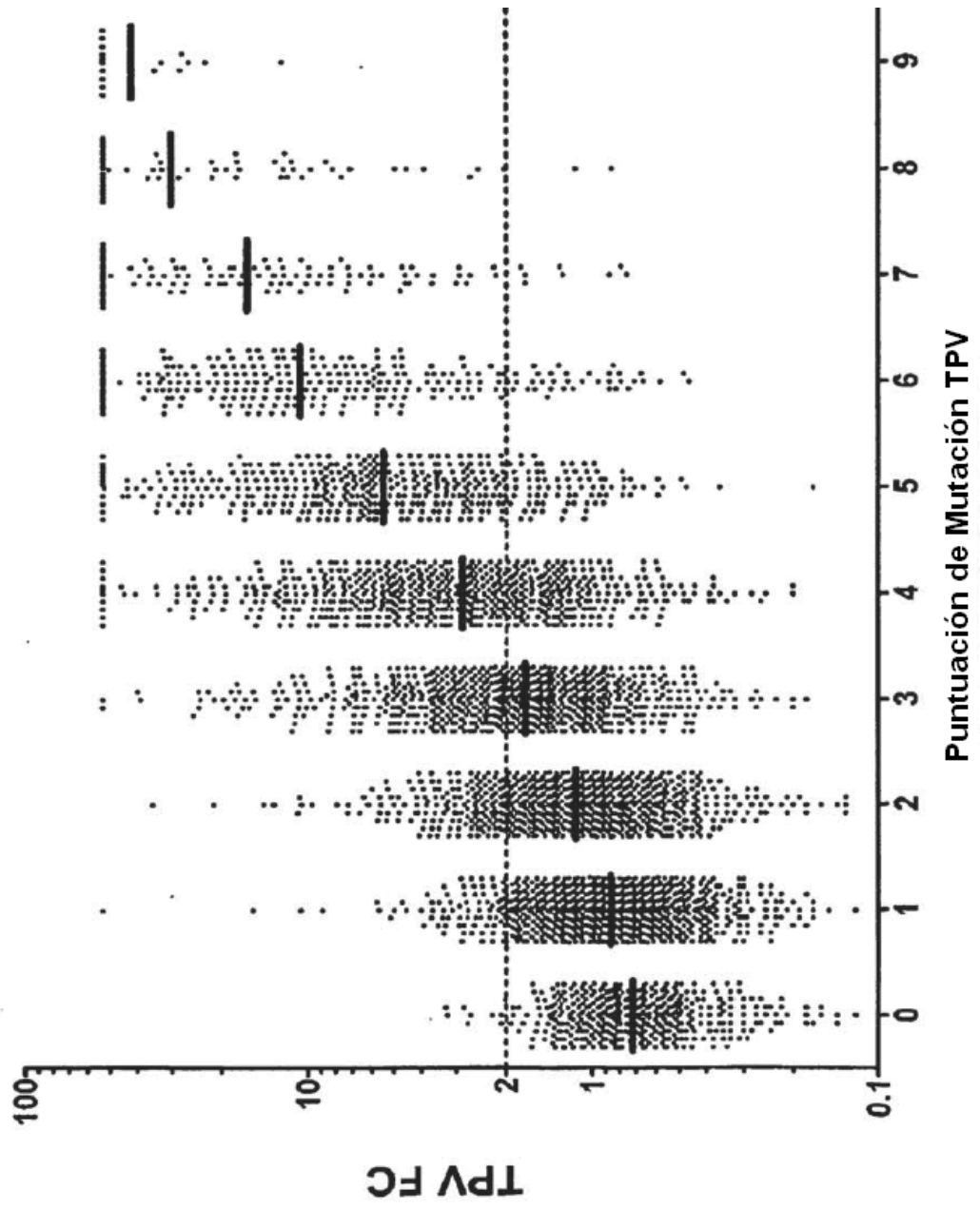


Figura 12A
Árbol de Regresión, log(TPV FC)

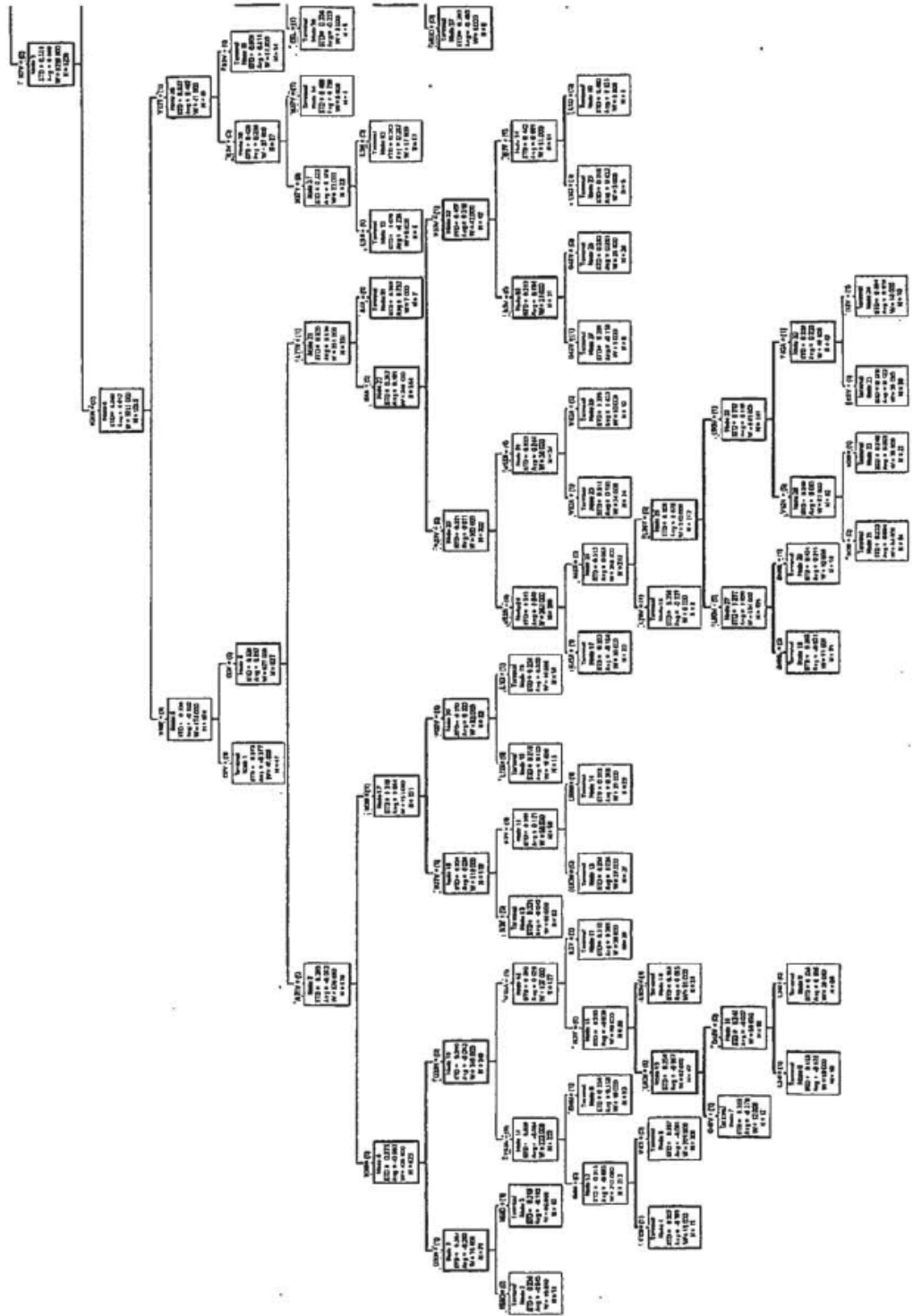


Figura 12B
Árbol de Regresión, log(TPV FC)

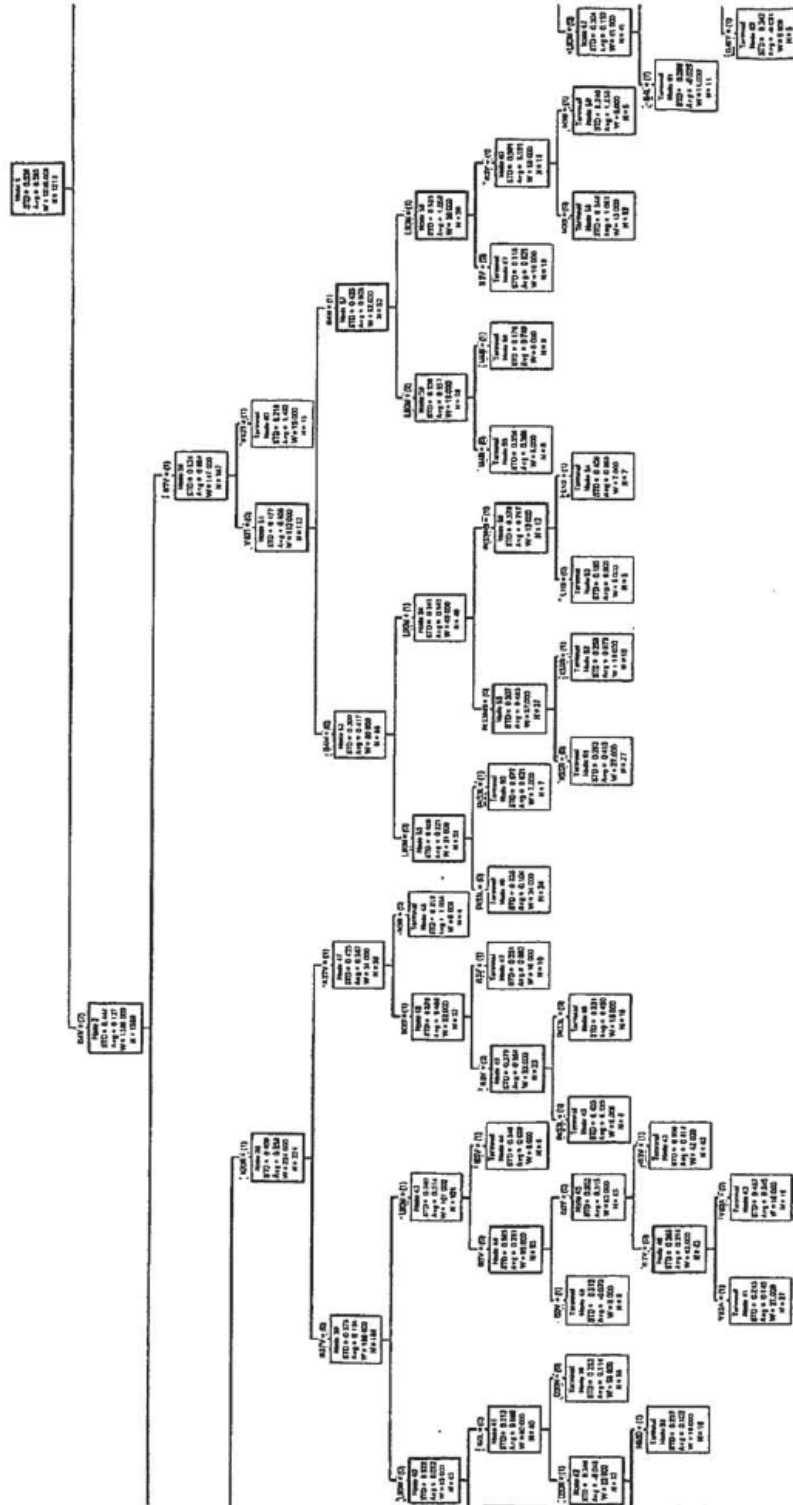
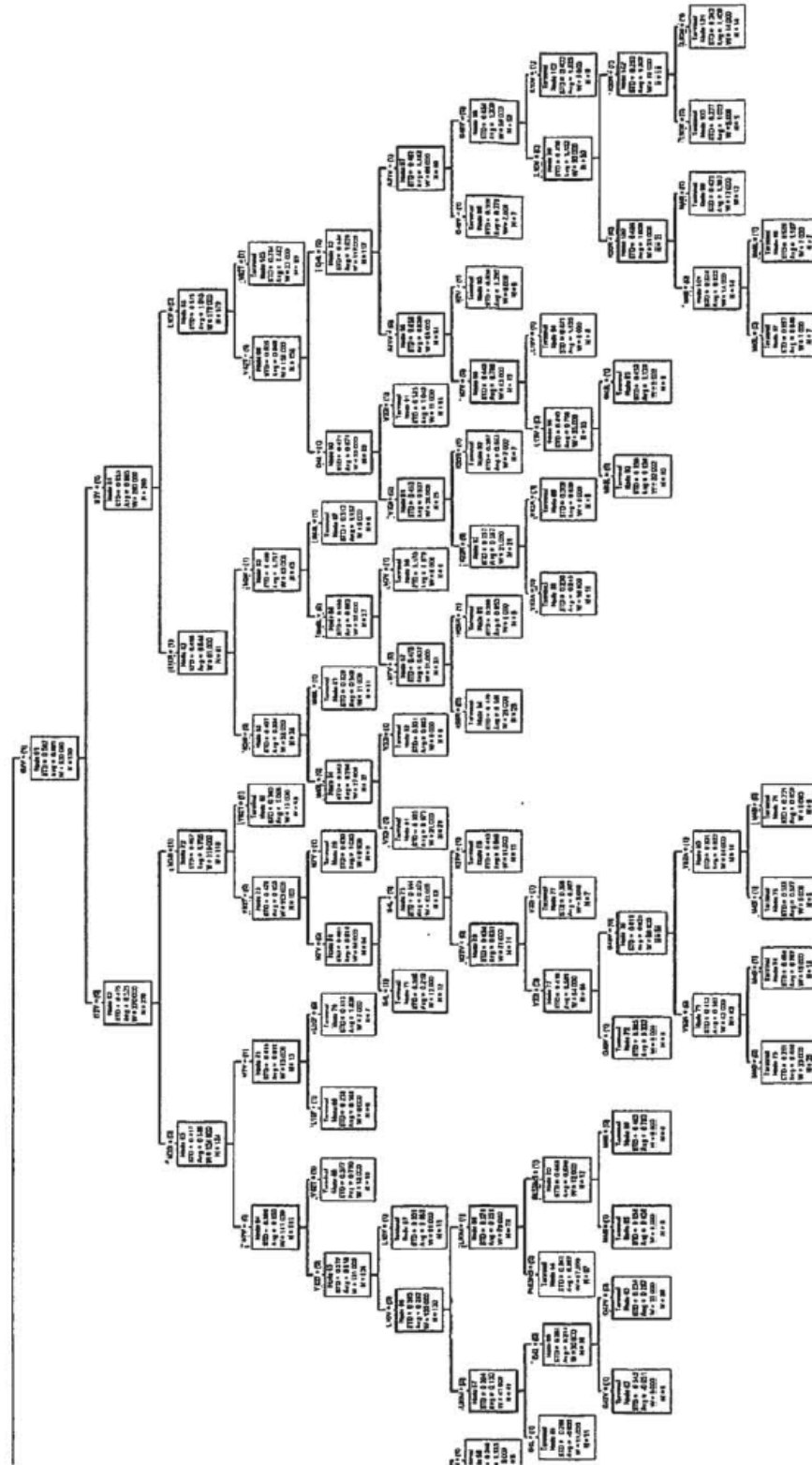


Figura 12C
Árbol de Regresión, log(TPV FC)



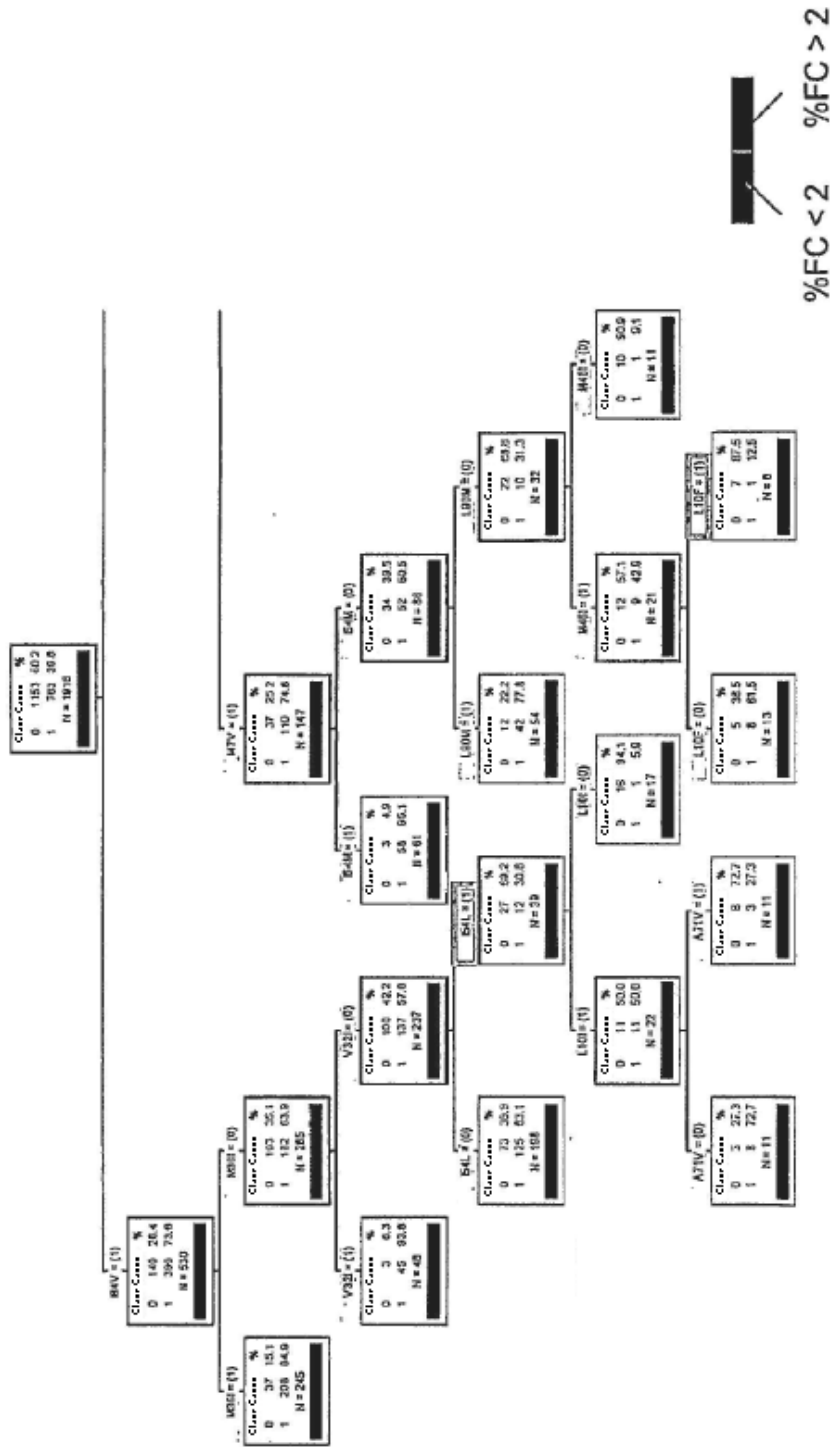


Figura 13B
 Árbol de Clasificación
 TPV FC < (izquierda) o > (derecha) 2 veces

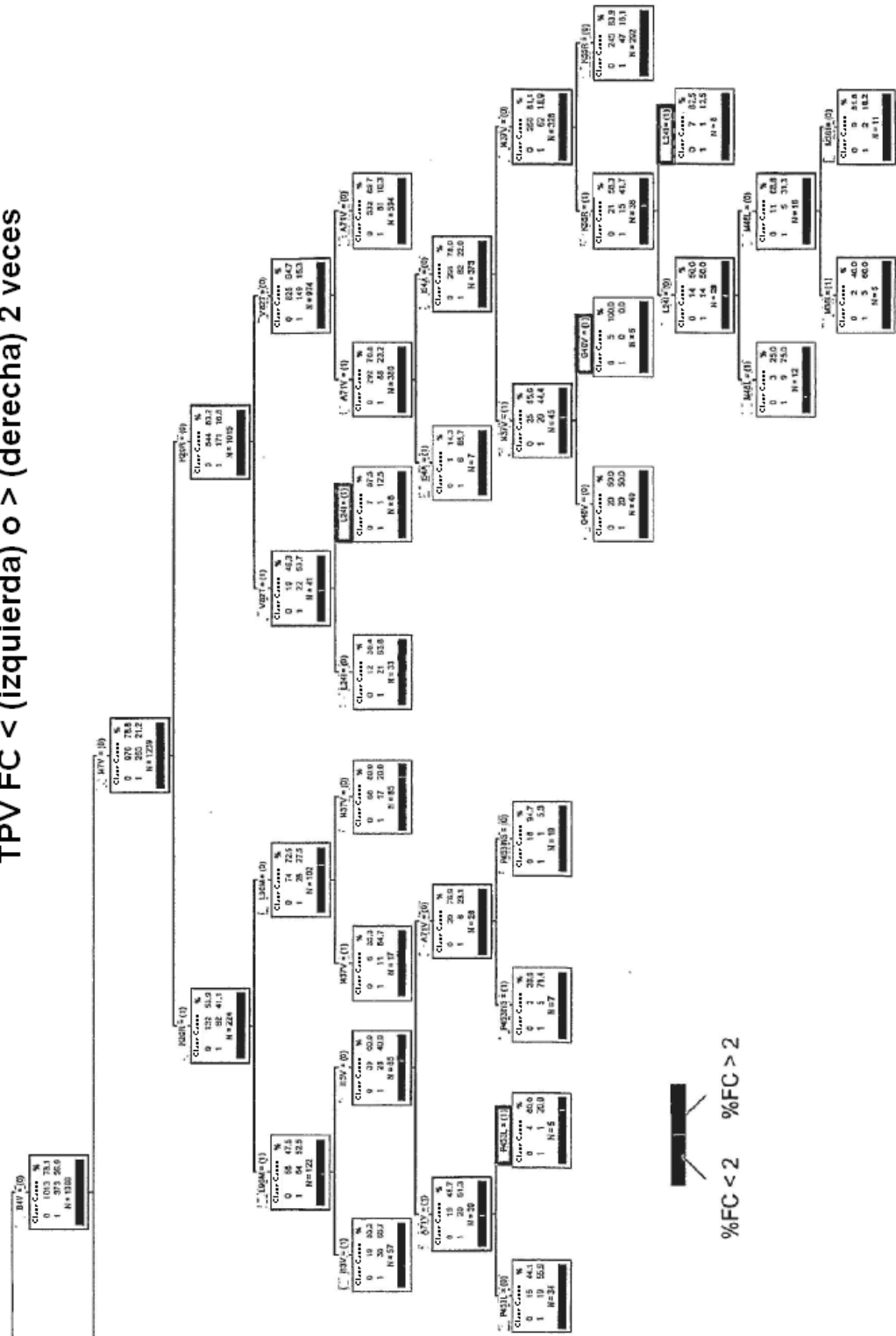
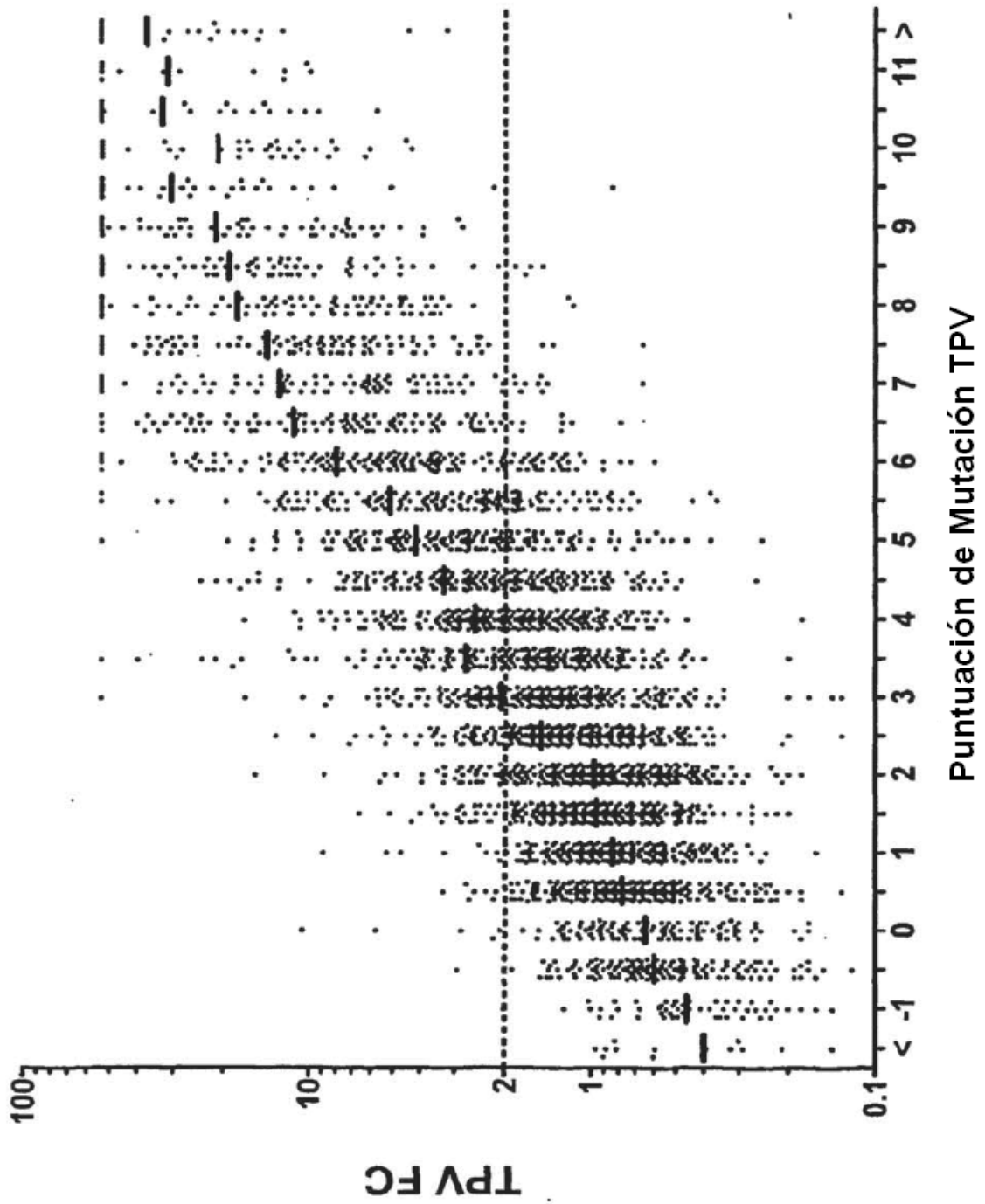


FIG.14



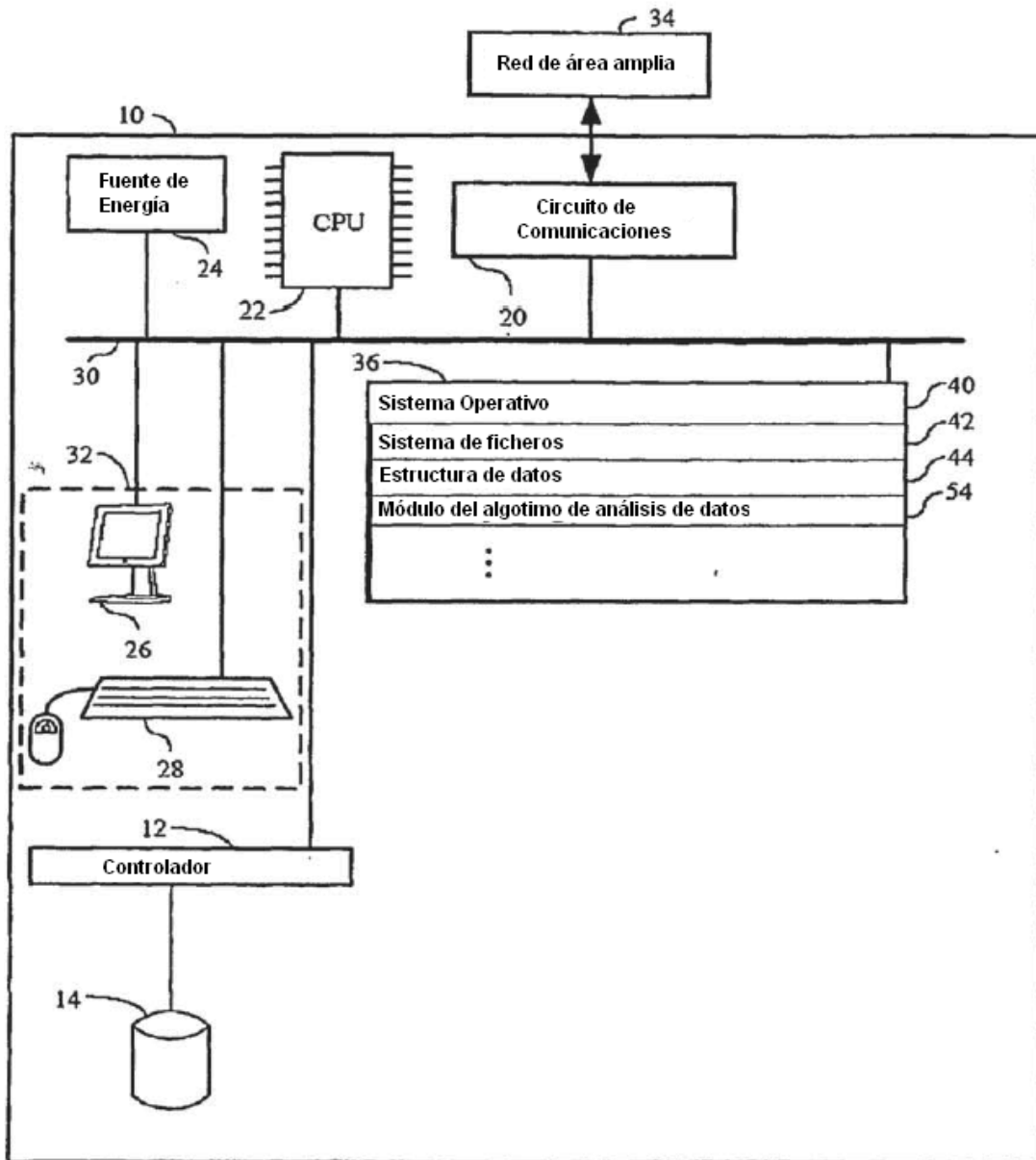


FIG.15