

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 094**

21 Número de solicitud: 200930737

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

25.09.2009

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.03.2012

Fecha de la concesión:

18.02.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

28.02.2013

73 Titular/es:

**FUNDACION PUBLICA ANDALUZA PARA LA
GESTION DE LA INVESTIGACION EN SALUD DE
SEVILLA
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCIO.
EDF. DE LABORATORIOS 6 PLT. AV. MANUEL
41013 SEVILLA (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

72 Inventor/es:

**PEREZ ROMERO, Pilar;
MIER MOTA, Julian;
PACHON DIAZ, Jeronimo;
LOPEZ CORTES, Luis F. y
VICIANA FERNANDEZ, Pompeyo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO DE DETECCIÓN PRECOZ DE RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN VIH.**

57 Resumen:

Método de detección precoz de resistencias al tratamiento antirretroviral en VIH.

La invención se refiere a una pareja de cebadores capaces de amplificar el gen pol del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de muestras plasmáticas que contienen bajos niveles de carga viral (entre 10 y 1.000 copias de RNA viral/mL de plasma, más preferiblemente entre 20 y 1.000 copias/mL y aún más preferiblemente entre 20 y 100 copias/mL). Así, estos cebadores permiten la detección de VIH en muestras biológicas que presentan baja carga viral. El ARN del VIH así detectado se puede genotipar para, posteriormente, establecer un perfil de mutaciones de resistencia al tratamiento antirretroviral (TAR) en el VIH en pacientes que presentan una carga viral baja. Los métodos de la invención pueden, por tanto, ser empleados para la detección temprana de las mutaciones que en el VIH son responsables del fracaso del TAR incluso en los casos en los que los niveles de viremia en plasma son bajos, lo que permite modificar el tratamiento precozmente, evitar la aparición de nuevas mutaciones y proteger la eficacia de fármacos del régimen de tratamiento actual y de otros que puedan ser administrados en un futuro.

ES 2 376 094 B1

DESCRIPCIÓN

Método de detección precoz de resistencias al tratamiento antirretroviral en VIH

La presente invención se encuadra en el campo de la biología molecular y de la medicina y se refiere a una pareja de cebadores capaces de amplificar el gen *pol* del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de muestras plasmáticas que contienen bajos niveles de carga viral (entre 20 y 1.000 copias de RNA viral/mL de plasma, y más preferiblemente entre 20 y 100 copias/mL). Así, estos cebadores permiten la detección de VIH en muestras biológicas que presentan baja carga viral, siendo el límite mínimo necesario para llevar a cabo dicha detección 20 copias de ARN viral por mL de muestra. El ARN del VIH así detectado se puede genotipar para, posteriormente, establecer un perfil de mutaciones de resistencia al tratamiento antirretroviral (TAR) en el VIH en pacientes que presentan una carga viral baja. Los métodos de la invención pueden, por tanto, ser empleados para la detección temprana de las mutaciones que en el VIH son responsables del fracaso del TAR incluso en los casos en los que los niveles de viremia en plasma son bajos, lo que permite modificar el tratamiento precozmente, evitar la aparición de nuevas mutaciones y proteger la eficacia de fármacos del régimen de tratamiento actual y de otros que puedan ser administrados en un futuro.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El objetivo actual del tratamiento antirretroviral (TAR) para el virus de inmunodeficiencia humana o VIH, es conseguir alcanzar una carga viral plasmática (CV) indetectable. En pacientes sin TAR previo y sin mutaciones de resistencia a los fármacos utilizados esto suele conseguirse en alrededor del 60-85% de los pacientes al año de iniciar el TAR. Sin embargo, en pacientes pretratados este objetivo no siempre es fácil de conseguir y estos porcentajes descienden considerablemente, incluso con la utilización de los nuevos fármacos. En los casos en los que ocurre una replicación viral

persistente a pesar del TAR, progresivamente van apareciendo y acumulándose mutaciones de resistencia a los distintos fármacos, habitualmente cruzadas dentro de una misma familia, que limitan las opciones terapéuticas, hasta el punto de que en un número significativo de
5 pacientes éstas acaban agotándose con claras repercusiones en la morbilidad y mortalidad de la infección por el VIH. Tanto es así, que ante un fracaso del TAR con un régimen de varios fármacos con frecuencia se puede constatar que se ha perdido la eficacia de al menos 1 o más de ellos, por lo que la siguiente combinación terapéutica se ha de diseñar en base a estos
10 datos.

Por ello, la detección de resistencias en el virus puede permitir correlacionar dicho fracaso con los distintos fármacos administrados y optimizar la terapia. En este sentido, existen dos tipos de técnicas para determinar resistencias
15 en el VIH al tratamiento antirretroviral: las genotípicas, que detectan mutaciones en el genoma del virus, y las fenotípicas, que analizan la sensibilidad del virus a los distintos fármacos. Los tests genotípicos se basan en la amplificación mediante, en primer lugar, una RT-PCR y en segundo lugar una PCR, de aquellas regiones del genoma viral implicadas en el
20 desarrollo de resistencias, habitualmente el gen de la transcriptasa inversa y de la proteasa (gen *pol*), para el posterior análisis de su secuencia nucleotídica (secuenciación) y su comparación con otras secuencias de referencia del VIH. Estas técnicas genotípicas son las más extendidas debido a su simplicidad, su bajo coste, su rapidez y su menor complejidad
25 técnica, por lo que existen varios kits comerciales disponibles (LIPA, TrueGene, Viroseq, VircoGen, etc.).

En la práctica clínica, los fármacos antirretrovirales se combinan basándose en la historia de TAR previos y en los tests genotípicos de resistencias que
30 dan información sobre los posibles fármacos que aún tienen actividad antiviral. No obstante, la principal limitación de los tests de resistencias actuales es que con viremias inferiores a 1.000 copias de ARN/mL de

plasma la muestra es muy difícil de amplificar y, por tanto, o bien no se solicitan o con frecuencia no ofrecen resultados, tanto más cuanto menor sea el nivel de viremia. En esta situación, se suele mantener el mismo TAR hasta que la CV supera las 1.000 copias de ARN/mL y se puede realizar dicho estudio y orientar el siguiente régimen de fármacos aunque el paciente esté en fracaso virológico mayor. Es decir, existe un vacío metodológico entre el nivel de viremia indicativo de fracaso del TAR (más de 20 copias de ARN/mL de plasma) y el nivel de viremia que la mayoría de los métodos genotípicos de detección de resistencias son capaces de detectar (superior o igual a 1.000 copias/mL), por lo que es complejo detectar resistencias en aquellos pacientes que sufren fracaso del TAR y que presentan entre 1.000 y 20 copias de ARN por mL de plasma.

En los casos en los que existen resistencias, esta viremia mantenida durante el TAR, aunque sea de bajo grado, no impide la acumulación de más mutaciones de resistencia que hacen que pueda perder eficacia algún otro fármaco de los que se están administrando.

Por tanto, el objetivo actual de los métodos genotípicos de detección de resistencias en VIH se centra en la posibilidad amplificar muestras con fracaso del TAR y niveles víricos inferiores a 1.000 copias/mL. En este sentido se han tratado de desarrollar varios métodos capaces de superar esta dificultad técnica. Algunos de ellos son los llevados a cabo mediante protocolos comerciales modificados, por ejemplo, añadiendo un paso opcional de centrifugación para concentrar el virus, previamente a la extracción del ARN, con lo que se ha podido establecer un umbral mínimo necesario de 100 copias/mL para la amplificación (Howard B. Gale, *et al.*, 2005, *45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, DC, Abstract H-1053). Incluso se han ensayado tests genotípicos de resistencias que permiten el análisis de muestras con cargas virales inferiores a 75 copias/mL, para cuya realización, se extrae el ARN utilizando un agente lítico, se lleva a cabo una RT-PCR para obtener el

cDNA y posteriormente se realiza una amplificación mediante PCR anidada de los genes de la proteasa y de la retrotranscriptasa (Mitsuya Y., *et al.*, 2006, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 43(1):56–59).

5 También existen los tests genotípicos de resistencias del VIH para pacientes con niveles de viremia inferiores a 50 copias/mL. El éxito de este procedimiento se debe a la introducción de un paso de ultracentrifugación para concentrar las partículas del virus y a una PCR anidada que emplea una polimerasa correctora de errores (Hermankova M., *et al.*, 2001, *JAMA*,
10 286 (2):196-207).

Asimismo, es posible obtener secuencias de ARN del VIH susceptibles de ser genotipadas desde muestras con niveles de viremia de 30-40 copias/mL, mediante el empleo de columnas de afinidad para extraer el ARN (Robert W.
15 Shafer, *et al.*, 1997, *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2):520–522).

En otra aproximación la detección de resistencias en el VIH se ha demostrado viable a partir de muestras con 5-10 copias de ARN/mL (WO20051121379 A2). Sin embargo, este método requiere la utilización de
20 un conjunto de cebadores y sondas específicas de cada mutación.

Por todo ello, sería deseable poder disponer de un test genotípico de resistencias en VIH más sensible que permita determinar mutaciones lo antes posible tras detectar un fracaso en el tratamiento antirretroviral aunque
25 la viremia sea de bajo grado, que además sea estándar para poder ser aplicado en la práctica clínica. Con ello, se podría modificar el TAR más precozmente, evitar la aparición de nuevas mutaciones y “proteger” fármacos del régimen actual y otros adicionales cuya actividad se vería comprometida con la aparición o acumulación de mutaciones.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una pareja de cebadores capaces de amplificar el gen *pol* del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de muestras plasmáticas que contienen bajos niveles de carga viral (entre 20 y 1.000 copias de RNA viral/mL de plasma, y más preferiblemente entre 20 y 100 copias/mL). Así, estos cebadores permiten la detección de VIH en muestras biológicas que presentan baja carga viral, siendo el límite mínimo necesario para llevar a cabo dicha detección 20 copias de ARN viral por mL de muestra. El ARN del VIH así detectado se puede genotipar para, posteriormente, establecer un perfil de mutaciones de resistencia al tratamiento antirretroviral (TAR) en el VIH en pacientes que presentan una carga viral baja. Los métodos de la invención pueden, por tanto, ser empleados para la detección temprana de las mutaciones que en el VIH son responsables del fracaso del TAR incluso en los casos en los que los niveles de viremia en plasma son bajos, lo que permite modificar el tratamiento precozmente, evitar la aparición de nuevas mutaciones y proteger la eficacia de fármacos del régimen de tratamiento actual y de otros que puedan ser administrados en un futuro.

20

En la presente invención, se ha combinado la optimización de varios pasos integrados en los métodos genotípicos comúnmente empleados para la detección de resistencias al TAR en el VIH (los relacionados con la concentración del RNA vírico, la combinación de *primers* y las características de las enzimas retrotranscriptasas y polimerasas utilizadas), para así alcanzar una mayor sensibilidad de los mismos.

25

Para ello, se ha diseñado una pareja de cebadores o *primers* capaces de amplificar el gen *pol* incluso desde muestras plasmáticas que presentan bajas copias virales (siendo el umbral mínimo necesario para dicha amplificación de 20 copias de ARN/mL).

30

Por otro lado, se han optimizado los pasos de aislamiento o extracción del ARN del virus mediante la concentración de la muestra a través del empleo de columnas de afinidad por ARN viral, así como las reacciones de amplificación, RT-PCR y PCR, en las que se han empleado una
5 retrotranscriptasa y una polimerasa de alta afinidad.

El resultado es que el protocolo así diseñado permite amplificar las secuencias víricas de interés a partir de muestras de plasma de pacientes que se encuentran por debajo del límite de copias virales mínimas
10 requeridas habitualmente con otros métodos genotípicos para la detección de mutaciones en VIH.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de detección precoz de VIH, de ahora en adelante “primer método de la
15 invención”, que comprende:

- a. obtener una muestra biológica aislada,
- b. extraer el ARN del VIH presente en la muestra del paso (a) mediante una columna de afinidad por ARN,
- 20 c. poner en contacto el ARN obtenido en el paso (b) con una mezcla de reacción que contiene los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2,
- d. retrotranscribir el gen *pol* del VIH y amplificar el ADNc obtenido mediante RT-PCR, y
- 25 e. detectar los productos de la RT-PCR obtenidos en el paso (d).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica del paso (a) presenta entre 10 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En una realización más preferida la muestra biológica del
30 paso (a) presenta entre 20 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En una realización aún más preferida, la muestra biológica del paso (a) presenta entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En

otra realización preferida, la muestra biológica aislada del paso (a) es plasma sanguíneo.

5 En otra realización preferida, la polimerasa empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es de alta afinidad. En otra realización preferida, la detección de los productos de la RT-PCR del paso (e) se realiza mediante electroforesis.

10 El “VIH o virus de inmunodeficiencia humana” es un retrovirus perteneciente a la subfamilia *Lentiviridae* y se caracteriza por provocar la enfermedad de evolución lenta denominada SIDA o Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Los viriones del VIH son partículas esféricas de entre 80 y 100 nm en las que se pueden distinguir tres capas concéntricas: una envoltura lipidoproteica, una nucleocápside icosaédrica central y en el interior de ésta
15 tanto el material genético como las enzimas necesarias para completar su ciclo vital (transcriptasa inversa, integrasa y proteasa). Su genoma es un RNA de cadena única constituido por dos hebras idénticas de polaridad positiva, de una longitud de 9.800 pares de bases, presentando tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y al menos seis genes reguladores, que en el
20 estado de provirus están limitados por unas secuencias repetidas (LTR) que facilitan su integración en el genoma de la célula huésped y que contienen los elementos reguladores del inicio de la transcripción viral.

Una muestra biológica aislada incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos
25 y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. En el primer método de la invención, la muestra biológica aislada del paso (a) es, preferiblemente, plasma sanguíneo, cuya obtención se puede llevar a cabo mediante extracción sanguínea y posterior separación de la sangre y el
30 plasma por centrifugación. Se entiende por “plasma sanguíneo” la fracción líquida y acelular de la sangre de color amarillento translúcido, compuesto en un 90% por agua y múltiples sustancias disueltas en ella, de las cuales las

más abundantes son las proteínas. También contiene glúcidos y lípidos, así como los productos de desecho del metabolismo. Es el componente mayoritario de la sangre, puesto que representa aproximadamente el 55% del volumen sanguíneo total. El 45% restante corresponde a los elementos
5 formes (tal magnitud está relacionada con el hematocrito).

Una vez obtenida la muestra de plasma, se extrae de ella el ARN del virus. Dicha extracción o aislamiento se podría realizar mediante protocolos de extracción del material genético viral, como por ejemplo, pero sin limitarnos,
10 el protocolo Qiagen, mediante agentes de lisis, como el tiocianato de guanidina, mediante separación en fase acuosa mediante saturación con fenol-cloroformo, o mediante extracción por adsorción en columnas de afinidad por ARN, como por ejemplo, pero sin limitarnos, en columnas de sílica (*silica beads*) o mediante el sistema de QIAamp Viral RNA Mini Kit
15 (QIAGEN, Valencia, CA, USA). En la presente invención, la extracción del ARN se realiza, preferiblemente, mediante columnas de afinidad por ARN, y más preferiblemente mediante el sistema de QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), ya que proporcionan una mayor efectividad en el proceso de extracción y aislamiento del material genético, y además
20 permiten la concentración del material genético contenido en la muestra a analizar, lo que es deseable especialmente en aquellas muestras que presentan bajos niveles de viremia (por debajo de 1.000 copias/mL y preferiblemente por debajo de 100 copias/mL), por lo que se obtiene ARN en una calidad y cantidad suficiente para su posterior análisis.

25 El gen *pol* del VIH puede ser retrotranscrito y amplificado en una reacción de amplificación adecuada para tal fin, como por ejemplo, la RT-PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa, que consiste en una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología
30 molecular para generar una gran cantidad de copias de ADNc. En la RT-PCR, una hebra de ARN es retrotranscrita en su ADN complementario (ADNc) mediante la acción de una enzima llamada transcriptasa reversa o

retrotranscriptasa, y posteriormente el ADNc resultado de este proceso se puede amplificar mediante una PCR tradicional con una enzima polimerasa.

5 Para amplificar un fragmento nucleotídico de ARN o ADN por RT-PCR o PCR, respectivamente, son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a una de las cadenas molde (cebador directo) y el otro a la cadena complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas amplificaciones con una enzima retrotranscriptasa y ADN polimerasa termorresistente, un fragmento que pueda ser detectado y/o
10 cuantificado.

Para la amplificación del gen *pol* del VIH se podrían diseñar numerosos cebadores. Sin embargo, cuando se diseñan cebadores es necesario hacer una serie de predicciones, como la temperatura de fusión (T_m), la presencia
15 de pares indeseables (a) o la posibilidad de formación de horquillas (b) que puedan reducir, por competencia, la efectividad de emparejamiento con la secuencia de ARN diana. Los cebadores específicos del gen *pol* podrían diseñarse mediante el alineamiento de secuencias de distintas estirpes del VIH, no obstante, no todos los cebadores diseñados permiten amplificar
20 muestras de ARN obtenidas de pacientes con niveles de viremia en plasma de entre 1.000 y 20 copias/mL, y más preferiblemente de entre 100 y 20 copias/mL, como demuestran los ejemplos de la presente invención. Así pues, los cebadores empleados en las reacciones de amplificación de la invención para el gen *pol* son los que se recogen en la SEQ ID NO: 1 (primer
25 5` gen *pol*) y en la SEQ ID NO: 2 (primer 3` gen *pol*), ya que permiten detectar la presencia de VIH en pacientes con niveles de viremia inferiores a 1.000 copias/mL y más preferiblemente inferiores a 100 copias/mL.

En la presente descripción, el termino "específicos" implica que los
30 cebadores comprenden una secuencia nucleotídica totalmente complementaria a la secuencia del gen *pol* empleado por el método de la presente invención.

El “gen *pol*” del VIH es uno de los tres genes principales comprendidos en el genoma del VIH y codifica para la proteasa y para la transcriptasa inversa.

5 La polimerasa empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es, preferiblemente, de alta afinidad. Preferiblemente, la mezcla de enzimas para la retrotranscripción y PCR (RT-PCR) empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es de Invitrogen: SuperScriptIII One-Step RT-PCR System con la polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

10 Una vez amplificado el ADNc mediante la RT-PCR del paso (d) los productos obtenidos en la reacción se pueden detectar mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, PCR cuantitativa, marcaje con sondas fluorescentes, o electroforesis, entre otros métodos. En una realización preferida, la detección de los productos de la RT-PCR obtenidos en el paso (d) se realiza
15 mediante su separación en una electroforesis. Se define “electroforesis” como una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (por ejemplo, electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa
20 (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa. La variante de uso más común para el análisis de mezclas de proteínas o de ácidos nucleicos utiliza como soporte un gel, habitualmente de agarosa o de poliacrilamida.
25 Los ácidos nucleicos disponen de una carga eléctrica negativa que los dirige al polo positivo. Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se mueven y deben ir pasando por la malla del gel (una red tridimensional de fibras cruzadas), por lo que las pequeñas se mueven mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzan más y las más
30 grandes quedan cerca del lugar de partida. Tras la electroforesis, se obtiene un patrón de bandas en el soporte empleado, preferiblemente, un gel de agarosa, correspondiente a los fragmentos de ADNc amplificados. Estas

bandas podrían ser purificadas y secuenciadas para obtener así el genotipo del virus.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de genotipado del VIH, de ahora en adelante “segundo método de la invención”, que comprende todos los pasos del primer método de la invención y además:

f. secuenciar los productos detectados en el paso (e).

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica del paso (a) presenta entre 10 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En una realización más preferida la muestra biológica del paso (a) presenta entre 20 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En una realización aún más preferida, la muestra biológica del paso
15 (a) presenta entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En otra realización preferida, la muestra biológica aislada del paso (a) es plasma sanguíneo.

En otra realización preferida, la polimerasa empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es de alta afinidad. En otra realización preferida, la detección
20 de los productos de la RT-PCR del paso (e) se realiza mediante electroforesis.

La polimerasa empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es, preferiblemente, de alta afinidad. Preferiblemente, la mezcla de enzimas
25 para la retrotranscripción y PCR (RT-PCR) empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es de Invitrogen: SuperScriptIII One-Step RT-PCR System con la polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

30 Se entiende por “genotipado” el proceso de determinación del genotipo (contenido genético) de un individuo mediante una prueba biológica. El

genotipado se aplica a un amplio rango de "individuos", incluyendo los microorganismos. Por ejemplo, se pueden genotipar virus o bacterias.

5 En el paso (f) del segundo método de la invención, se purifican las bandas obtenidas en el gel de electroforesis del paso (e) y se secuencian. La purificación puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica conocida que sirva para tal fin, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante el kit de purificación de bandas en gel QIAquick gel extraction (QIAGEN, Valencia, CA, USA); así como la secuenciación, la cual podría realizarse, por ejemplo,
10 pero sin limitarnos, en un secuenciador automático. El término "secuenciación" hace referencia al conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

15 Tras la secuenciación se dispone de la información ordenada de la secuencia de nucleótidos del gen *pol*, presente en la muestra analizada, por lo que la comparación de esta secuencia obtenida con una base de datos que recoja información genética sobre esta secuencia del VIH, permitiría determinar la posición nucleotídica de todas las mutaciones presentes en la
20 secuencia estudiada y así un patrón de mutaciones de resistencia del virus al tratamiento antirretroviral.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección precoz de mutaciones de resistencia del VIH al tratamiento antirretroviral, de
25 ahora en adelante "tercer método de la invención", que comprende todos los pasos del primer y segundo método de la invención, y además:

g. comparar las secuencias obtenidas en el paso (f) con una base de datos de secuencias del VIH.

30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica del paso (a) presenta entre 10 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En una realización más preferida la muestra presenta entre

20 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En una realización aún más preferida, la muestra biológica del paso (a) presenta entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de muestra. En otra realización preferida, la muestra biológica aislada del paso (a) es plasma sanguíneo.

5

En otra realización preferida la polimerasa empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es de alta afinidad. En otra realización preferida, la detección de los productos de la RT-PCR del paso (e) se realiza mediante electroforesis.

10

La polimerasa empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es, preferiblemente, de alta afinidad. Preferiblemente, la mezcla de enzimas para la retrotranscripción y PCR (RT-PCR) empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es de Invitrogen: SuperScriptIII One-Step RT-PCR System con la polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

15

Tal y como aparece en la presente descripción, el término “precoz” se refiere a la detección de VIH, genotipado de VIH y/o detección de mutaciones de resistencia al tratamiento antirretroviral en el VIH en muestras biológicas aisladas de pacientes que presentan entre 10 y 1.000 copias de ARN viral/mL de muestra, más preferiblemente ente 20 y 1.000 copias de ARN viral/mL de muestra, y aún más preferiblemente, entre 20 y 100 copias de ARN viral/mL de muestra. Es decir, el primer, segundo y tercer método de la invención, gracias a los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, a la retrotranscriptasa y a la polimerasa empleadas y al método de extracción o aislamiento de ARN viral basado en la utilización de columnas de afinidad por ARN, permite amplificar, en el primer método de la invención, para su posterior genotipado en el segundo método de la invención, ARN del VIH obtenido a partir de muestras con bajas cargas virales, entendiéndose como tales las comprendidas entre 10 y 1.000 copias de ARN viral/mL de muestra, más preferiblemente entre 20 y 1.000 copias de ARN viral/mL de muestra, y aún más preferiblemente, entre 20 y 100 copias de ARN viral/mL de

20

25

30

muestra, lo cual supone una mejora en la sensibilidad con respecto a otros métodos de detección y genotipado de VIH, por ello, una vez que se dispone de la secuencia nucleotídica del gen *pol* de la estirpe del virus que infecta la muestra a analizar es posible obtener su patrón de mutaciones si se
5 compara con una base de datos adecuada en el tercer método de la invención. En este sentido, existen numerosas bases de datos donde se encuentran recogidas las secuencias del VIH útiles para llevar a cabo el tercer método de la invención, entre ellas, pero sin limitarnos, *HIV-1 Resistance Mutation Database*, *HIV Sequence Database* o *HIV Drug Resistance Database*. En el paso (g) del tercer método de la invención, la
10 base de datos de secuencias del VIH empleada para comparar las secuencias obtenidas en el paso (f) del segundo método de la invención es, preferiblemente, la *HIV Drug Resistance Database* (Stanford University), base de datos de carácter público diseñada para el almacenamiento y
15 análisis de secuencias divergentes que producen resistencias al VIH disponible en <http://hivdb.stanford.edu/>.

El término “mutaciones de resistencia” engloba toda las posibles alteraciones de la secuencia nucleotídica de ARN del VIH o de la secuencia nucleotídica de su ADNc que afectan a la sensibilidad del virus a los fármacos empleados
20 en el tratamiento antirretroviral. Se entiende por “resistencias” el conjunto de mecanismos que un microorganismo patógeno (virus, bacteria o parásito) puede desarrollar con el fin de evadir la presión ejercida por los fármacos suministrados al paciente infectado, cuyo resultado es la pérdida total o
25 parcial de la actividad del medicamento. El “tratamiento antirretroviral o TAR” es aquel que supone la administración de medicamentos o combinaciones de medicamentos para combatir los efectos causados como consecuencia de la infección por el retrovirus del VIH, causante del SIDA.

30 La muestra biológica aislada del primer, segundo y tercer método de la invención proviene, preferiblemente, de pacientes que se encuentran recibiendo un TAR, y más preferiblemente, de pacientes que se encuentran

recibiendo un TAR y que además presentan un fracaso de dicho tratamiento, definiéndose como “fracaso del TAR” aquellos niveles de ARN de VIH superiores a 20 copias por mL de muestra, en muestras procedentes de pacientes recibiendo TAR.

5

Por otro lado, la muestra biológica aislada del primer, segundo y tercer método de la invención presenta, preferiblemente, entre 20 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra y más preferiblemente entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de muestra, no obstante, como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, es posible obtener producto de amplificación a partir de muestras plasmáticas con 14 copias/mL, por lo que un experto en la materia podría pensar que también puede ser posible obtenerlo para un umbral mínimo de copias inferior, como 10 copias/mL. Por tanto, la muestra biológica aislada del primer, y por consiguiente, del segundo y tercer método de la invención presenta, preferiblemente, entre 10 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra, más preferiblemente entre 20 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra y aún más preferiblemente, entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de muestra.

Como se ha explicado anteriormente, los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, utilizados en reacciones adecuadas, son capaces de amplificar el gen *pol* del VIH, por lo que son de utilidad para llevar a cabo cualquiera de los tres métodos de la invención. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, de ahora en adelante “cebadores de la invención”.

Un “cebador o primer” es una secuencia de un oligonucleótido específico complementario a una secuencia nucleotídica diana con la que es capaz de hibridar y servir como punto de iniciación para una polimerización nucleotídica catalizada por ARN polimerasa, ADN polimerasa o transcriptasa reversa.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los cebadores de la invención para amplificar el gen *pol* del VIH en una muestra de plasma que presenta entre 10 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de plasma. En una realización preferida la muestra de plasma presenta entre 20 y 1.000 copias
5 de ARN de VIH por mL de plasma. En una realización más preferida, la muestra de plasma presenta entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de plasma.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de detección y/o genotipado del VIH, de ahora en adelante "kit de la invención", que comprende los
10 cebadores de la invención. En una realización preferida, el kit de la invención además comprende una polimerasa de alta afinidad.

En la presente invención se entiende por polimerasas de alta afinidad, por
15 ejemplo pero sin limitarnos, la polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), la polimerasa EuroTaq (Genycell Biotech) o la polimerasa BlueTaq (Genycell Biotech). El kit de la invención comprende, preferiblemente, la polimerasa Platinum *Taq* incluida en la mezcla SuperScriptIII One-Step RT-PCR System (Invitrogen).

20

Dicho kit puede comprender, sin limitarnos, los medios necesarios para llevar a cabo la extracción de la muestra biológica aislada, así como columnas de afinidad por ARN vírico, como por ejemplo pero sin limitarnos, el sistema de QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA),
25 también soluciones de lavado y elución, cebadores, sondas, dNTPs, medios y columnas necesarios para la purificación, como por ejemplo pero sin limitarnos, el kit de purificación de bandas en gel QIAquick gel extraction (QIAGEN, Valencia, CA, USA) y todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención. El kit además puede
30 incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, incluyendo tampones de lisis, polimerasas y retrotranscriptasas, preferiblemente de alta afinidad y bajo número de errores, y más preferiblemente la mezcla

enzimática SuperScriptIII One-Step RT-PCR System con la polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá todos los elementos necesarios para la detección precoz de VIH, el genotipado del VIH y la detección precoz de resistencias del VIH al tratamiento antirretroviral a partir de muestras biológicas aisladas, preferiblemente plasma sanguíneo, por las técnicas que se han descrito anteriormente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Representa el diseño del protocolo de retrotranscripción y amplificación del gen *pol* partiendo de muestras de plasma con carga viral menor a 1.000 copias. El RNA extraído del plasma fue empleado como molde para la reacción de retrotranscripción seguida de PCR (RT+PCR) utilizando la combinación de primers 5´-1911 y 3´-3602 (previamente testada como la mejor combinación y especificada en los ejemplos descritos) con homología en los extremos 3´ y 5´ de la región *pol*, en distintas diluciones conteniendo diferentes concentraciones de RNA viral (D1, D2, D3, D4, D5...).

Fig. 2. Muestra el gel de electroforesis al 1% con las muestras resultantes de la reacción de retrotranscripción seguida de una amplificación por PCR. PM: marcador de peso molecular en pares de bases.

5

Fig. 3. Representa la amplificación del gen *pol* a partir de una muestra con una carga viral de 85 copias/mL. El RNA extraído fue utilizado para la reacción de retrotranscripción-PCR (RT-PCR). Los productos de la reacción fueron cargados en un gel de electroforesis al 1% y la banda de amplificación se muestra en la figura junto con el marcador de peso molecular (PM).

10

EJEMPLOS

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de los métodos de detección, genotipado y detección de resistencias del VIH al tratamiento antirretroviral en muestras plasmáticas que presentan bajos niveles de carga viral (entre 20 y 1.000 copias de ARN viral/mL de plasma). Estos ejemplos
20 específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

25

Ejemplo 1. Amplificación del ARN del VIH desde muestras plasmáticas que presentan de 20 a 1.000 copias de ARN/mL.

1.1. Muestras biológicas.

30

Las muestras analizadas han sido recogidas de pacientes que están recibiendo TAR y presentan fracaso del mismo con viremias plasmáticas

bajas: entre 20 y 1.000 copias RNA-VIH-1/mL. Se considera fracaso del TAR cuando la carga viral o copias de RNA-VIH-1/mL en plasma es superior a 20 copias/mL. A todos los candidatos se les solicita la participación en el estudio a través de consentimiento informado.

5

Para el aislamiento del ARN viral se utilizan muestras de plasma aislado de la sangre en tubos de 5 ml K2-EDTA con separador.

1.2. Diseño de cebadores.

10

En primer lugar, utilizando alineamientos de secuencias de distintas estirpes de VIH y como referencia el provirus de VIH-1 pNL4.3 (número de acceso del genBank: M19921), se diseñaron distintos cebadores frente a regiones conservadas en los extremos 5' y 3' de gen *pol* que incluye los genes que codifican la proteasa y la retrotranscriptasa. En la tabla 1 se muestran algunos de los primers o cebadores diseñados y testados para ello.

15

Primer	Secuencia
5'-1911	5'-TACCATAATGATACAGAAAGGCAA-3'
5'-1941	5'-GAACCAAAGAAAGACTGTTAGTG-3'
5'-1931	5'-GCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGAC-3'
5'-1986	5'-CACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCC-3'
3'-3602	5'-TGGGCACCCTTCATTCTTGCATA-3'
3'-3514	5'-TTGATGGGTCATAATACACTCCATGT-3'
3'-3521	5'-TGCATCTGTATTTCTGCTATTAAG-3'
3'-3577	3'-GATAAATTTGATATGTCCATTGGCCT-5'

20 **Tabla 1.** Nombre de los primers, y sus secuencias, diseñados para la amplificación del gen *pol*.

1.3. Determinación del número de copias/mL mínimo necesario para la amplificación.

En primer lugar se determinó el número mínimo de copias de ARN del virus por mL de plasma necesario para obtener producto de amplificación susceptible de ser secuenciado. En la figura 1 se muestra el protocolo de diseñado. Partiendo de una muestra de plasma con carga viral y genotipo conocidos, se realizó la extracción de RNA vírico utilizando el protocolo de extracción de RNA viral QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA).

Partiendo de las 1.743 copias de RNA vírico aislado, se realizaron diluciones seriadas en base dos (mezclando 15 μ L del RNA y 15 μ L de H₂O libre de RNasa) hasta llegar a una dilución aproximada de 5 copias/mL. De cada una de las diluciones, 10 μ L fueron utilizados como molde junto con los primers específicos en una reacción de retrotranscripción seguida de una amplificación por PCR utilizando enzimas (retrotranscriptasa y polimerasa) de alta fidelidad (Invitrogen).

La reacción de retrotranscripción se incubó a 55°C durante 30 minutos, seguida de la amplificación por PCR con las condiciones de amplificación siguientes: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C; 90 segundos a 68°C y un último ciclo de 5 minutos a 68°C, tras el cual las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su utilización. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Los resultados obtenidos con las distintas combinaciones de primers utilizadas mostraron el producto de amplificación esperado correspondiente al tamaño del gel *poI* únicamente para la combinación de primers: 5´-1911 y 3´-3602 (Tabla 1).

La dilución más pequeña en la que se obtuvo producto de amplificación corresponde al número mínimo de copias de RNA vírico/mL que deberá ser usado posteriormente para la amplificación de las muestras en estudio. Como se muestra en la figura 2 la dilución 7 (D7) fue la dilución más pequeña en la que se obtuvo producto de amplificación, que corresponde a 14 copias totales de RNA vírico.

1. 4. Protocolo de amplificación.

Una vez conocido el umbral mínimo de copias/mL necesario para conseguir una amplificación exitosa, se llevó a cabo la amplificación y genotipado de diferentes muestras plasmáticas con niveles de carga viral variables. Se realizó para ello la extracción de RNA vírico a partir de plasma aislado de pacientes utilizando el protocolo de extracción de ARN viral (Qiagen). En los pacientes con un número de copias de RNA/mL de sangre muy bajo, se concentró la muestra pasando el volumen de plasma necesario para obtener la carga viral mínima por una columna de afinidad por RNA del sistema de QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA).

A continuación, se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción utilizando como molde el RNA vírico aislado junto con distintas combinaciones de los primers específicos diseñados (Tabla 1). El cDNA obtenido fue utilizado a continuación para la amplificación por PCR utilizando una enzima polimerasa de alta afinidad de SuperScriptIII One-Step RT-PCR System con la polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Los resultados obtenidos con las distintas combinaciones de primers utilizadas mostraron el producto de amplificación esperado correspondiente al tamaño del gel *pol* únicamente para la combinación de primers: 5´-1911 y 3´-3602 (Tabla 1).

La reacción de retrotranscripción se incubó a 55°C durante 30 minutos, seguida de la amplificación por PCR con las condiciones de amplificación siguientes: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C; 90 segundos a 68°C y un último ciclo de 5 minutos a 68°C, tras el cual las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su utilización. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

El protocolo de amplificación se llevó a cabo con éxito en un total de 50 muestras con carga viral por debajo de 1.000 copias/mL. En la figura 3 se muestra un ejemplo utilizando plasma de un paciente con carga viral de 85 copias/mL.

Se obtuvo producto de amplificación en todos los casos mostrados en la tabla 2, en la que se representa la utilización de este protocolo en un total de 14 muestras de pacientes con carga viral menor a 200 copias/mL. El protocolo diseñado permite, por tanto, obtener un límite de detección de la amplificación de 20 copias de RNA totales por mL de plasma.

Paciente	Carga viral (copias RNA/mL)	Volumen plasma (µL)
G0	85	470
G5	98	560
G6	130	560
G8	72	560
G10	20	560
G12	20	560
G14	161	420
G23	122	420
G25	104	420
G27	154	420
G56	89	560
G59	96	560

G64	124	420
G66	92	560

Tabla 2. Características de los pacientes con carga viral inferior a 200 copias/mL en los que se ha aplicado el protocolo de amplificación y genotipado optimizado. Se destaca para cada paciente la carga viral (copias RNA/mL) de partida y el volumen de plasma necesario para el aislamiento de RNA.

Ejemplo 2. Genotipado del VIH a partir de muestras plasmáticas que presentan de 20 a 1.000 copias de ARN/mL.

10 Para verificar la calidad de las secuencias del gen *pol*, obtenidas tras la amplificación, se procedió a la secuenciación de los productos obtenidos. Para ello, las bandas obtenidas y separadas en el gel de electroforesis como se explica en el apartado anterior fueron cortadas y purificadas utilizando el kit de purificación de bandas en gel QIAquick gel extraction (QIAGEN, Valencia, CA, USA). En todos los casos la concentración de las bandas purificadas osciló entre 35 y 40 ng/μL. Para la secuenciación (Secugen, España) de cada producto de amplificación fue necesario un volumen mínimo de 15 μL.

20 **Ejemplo 3. Determinación precoz de mutaciones de resistencia a partir de muestras plasmáticas que presentan de 20 a 1.000 copias de ARN/mL.**

25 Las secuencias obtenidas correspondientes al gen *pol* fueron analizadas utilizando la base de datos gratuita y disponible a través de la Universidad de Stanford (*HIV Drug Resistance Database*: <http://hivdb.stanford.edu/>) para obtener el patrón de resistencias.

30 La calidad de las secuencias obtenidas fue comparada con las obtenidas previamente para el mismo paciente utilizando el programa vector NTI 10.3.0 (Invitrogen Corporation). El alineamiento de las secuencias obtenidas con las

disponibles con anterioridad mostraron una identidad del 100%,
demostrando que las secuencias obtenidas en los productos de
amplificación, no difieren del genotipo obtenido utilizando métodos
convencionales, obteniendo así una alta fidelidad en el genotipado final y,
5 por tanto, que se pueden obtener secuencias desde muestras con un
número mínimo de 20 copias del genoma viral, demostrando la optimización
del método.

**Ejemplo 4. Optimización del tratamiento antirretroviral en base a la
10 detección precoz de mutaciones de resistencia.**

4. 1. Hipótesis.

La optimización del tratamiento antirretroviral de manera precoz en pacientes
15 con fracaso virológico, en base a la determinación del genotipo viral es
esencial para seleccionar nuevas combinaciones de fármacos a las que el
virus sea sensible, y conseguir suprimir de nuevo la replicación viral evitando
la acumulación de nuevas mutaciones que puedan comprometer futuros
tratamientos.

20

4. 2. Objetivo General.

Optimizar el tratamiento antirretroviral de forma precoz en pacientes con
fracaso virológico y con viremias bajas y en pacientes con fracaso virológico
25 asociado al uso del inhibidor de la integrasa, adaptando su prescripción a las
mutaciones de resistencia observadas y a las concentraciones de fármaco
valle observadas.

30

4. 3. Objetivos específicos.

1. Amplificar los genes de la retrotranscriptasa y proteasa en pacientes en fracaso virológico con carga viral plasmática por debajo de 1.000 copias/ml.
2. Determinar las mutaciones de resistencias asociadas a los genes de la retrotranscriptasa y la proteasa amplificados.
3. Adaptar la dosificación de los fármacos en función de las mutaciones de resistencia observadas.

4. 4. Diseño.

Para ello se recogieron muestras de plasma de pacientes que presentaban fracaso virológico con cargas virales inferiores a 1.000 copias/ml. A partir de las muestras de plasma, se llevó a cabo por RT-PCR, la retrotranscripción del ARN de VIH aislado y la posterior amplificación de los genes de la retrotranscriptasa y la proteasa para su secuenciación y obtención del genotipo viral. En base a la historia previa de tratamiento y a los resultados del ensayo genotípico de resistencias se modificó el TAR de forma que el nuevo régimen contase con ≥ 2 fármacos completamente activos. Finalmente, se evaluó la eficacia del programa de optimización del tratamiento antirretroviral en pacientes con fracaso virológico con baja carga viral valorando el porcentaje de pacientes incluidos que consiguen una CV indetectable tras el cambio de tratamiento. A todos los candidatos se les solicitó la participación en el estudio a través de consentimiento informado.

4. 5. Resultados.

Hasta la fecha han sido incluidos 47 pacientes que presentaban fracaso viral con cargas virales por debajo de 1.000 copias/ml. Se recogieron muestras

de plasma de las que se aisló el ARN vírico que se utilizó como molde para amplificar por RT-PCR los genes de la retrotranscriptasa y la proteasa. Los productos amplificados fueron secuenciados y se obtuvo el genotipo viral.

- 5 En 21 de los casos (44%) se optó por cambiar el tratamiento en base al genotipo obtenido y a la historia previa de tratamiento. Como consecuencia, en 19 (91%) de los pacientes la carga viral se hizo indetectable tras el cambio de tratamiento. En los dos pacientes restantes aún no ha pasado el tiempo necesario para su evaluación.

10

4. 6. Conclusión.

Como consecuencia de la optimización del tratamiento, en base a la determinación precoz del genotipo viral en pacientes con fracaso virológico con cargas virales por debajo de 1.000 copias/ml, se consigue alcanzar una carga viral plasmática indetectable que es el objetivo actual del tratamiento antirretroviral.

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Método de detección precoz de VIH que comprende:
 - 5 a. obtener una muestra biológica aislada,
 - b. extraer el ARN del VIH presente en la muestra del paso (a) mediante una columna de afinidad por ARN,
 - c. poner en contacto el ARN obtenido en el paso (b) con una mezcla de reacción que contiene los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2,
 - 10 d. retrotranscribir el gen *pol* del VIH y amplificar el ADNc obtenido mediante RT-PCR, y
 - e. detectar los productos de la RT-PCR obtenidos en el paso (d).
- 15 2. Método de genotipado del VIH que comprende todos los pasos según la reivindicación 1 y además:
 - f. secuenciar los productos detectados en el paso (e).
- 20 3. Método de detección precoz de mutaciones de resistencia del VIH al tratamiento antirretroviral que comprende todos los pasos del método según la reivindicación 1 y del método según la reivindicación 2, y además:
 - 25 g. comparar las secuencias obtenidas en el paso (f) con una base de datos de secuencias del VIH.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la muestra biológica del paso (a) presenta entre 10 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra.
- 30

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la muestra biológica del paso (a) presenta entre 20 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de muestra.
- 5 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la muestra biológica del paso (a) presenta entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de muestra.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la muestra
10 biológica aislada del paso (a) es plasma sanguíneo.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la polimerasa empleada en cualquiera de los pasos (c) y (d) es de alta afinidad.
15
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la detección de los productos de la RT-PCR del paso (e) se realiza mediante electroforesis.
- 20 10. Cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
11. Uso de los cebadores según la reivindicación 10 para amplificar el gen *pol* del VIH en una muestra de plasma que presenta entre 10 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de plasma.
25
12. Uso de los cebadores según la reivindicación 11 donde la muestra de plasma presenta entre 20 y 1.000 copias de ARN de VIH por mL de plasma.
- 30 13. Uso de los cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 donde la muestra de plasma presenta entre 20 y 100 copias de ARN de VIH por mL de plasma.

14. Kit de detección y/o genotipado del VIH que comprende los cebadores según la reivindicación 10.
- 5 15. Kit de detección y/o genotipado del VIH según la reivindicación 14 que además comprende una polimerasa de alta afinidad.

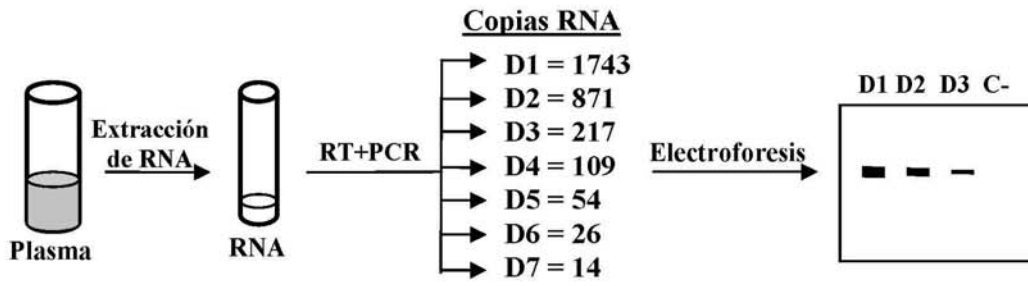


FIG. 1

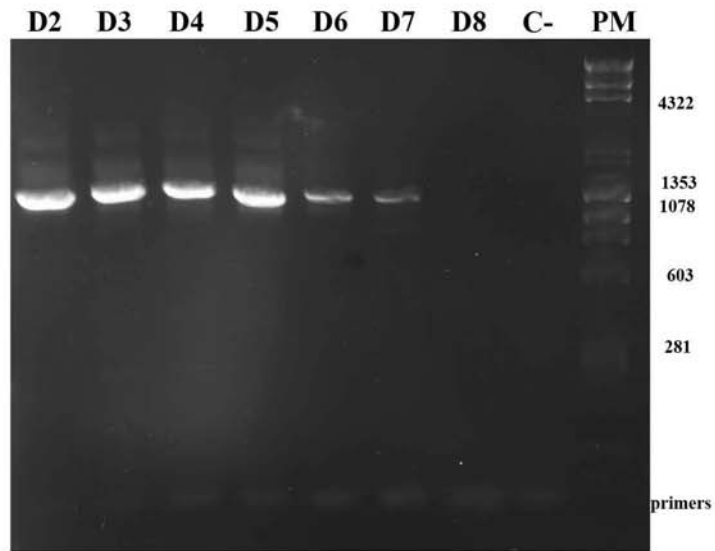


FIG. 2

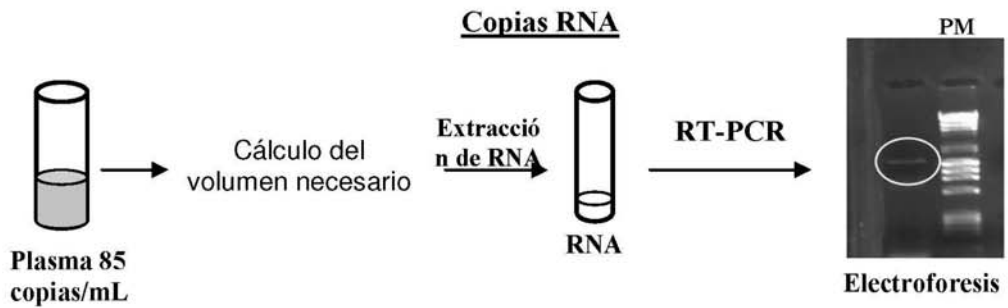


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200930737

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)
C07H21/02 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20050015039 A1 (KARL SALZWEDEL, O. et al.) 20.01.2005, resumen; párrafos 0111-0406; tabla 1.	1-3,7-11,14-15
Y	RHEE, S.Y. et al. Predictive Value of HIV-1 Genotypic Resistance Test Interpretation Algorithms. J INECT DIS 2009, 200 83: 453-463 ISSN: 022-1899. Resumen, métodos y conclusiones.	1-15
A	US 6271354 B1 (ALAGARSAMY SRINIVISAN, G.M. et al.) 07.08.2001, resumen; descripción.	1,10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.01.2011

Examinador
I. Abad Gurumeta

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C07H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2005/0015039 A1 (KARL SALZWEDEL, O. et al.).	20.01.2005
D02	RHEE, S.Y. et al. Predictive Value of HIV-1 Genotypic Resistance Test Interpretation Algorithms. J INECT DIS	2009
D03	US 6271354 B1 (ALAGARSAMY SRINIVISAN, G.M. et al.)	07.08.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-15, es una pareja de cebadores SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 (reivindicación 10), su uso para amplificar el gen *pol* del VIH (reivindicación 11) y en los métodos de: detección precoz de VIH (reivindicación 1), genotipado del VIH (reivindicación 2) y detección precoz de mutaciones de resistencia del VIH (reivindicación 3), en los cuales se usan muestras biológicas que presentan baja carga viral (reivindicaciones 4-6 y 12-13). También tiene por objeto el kit de detección y/o genotipado del VIH. (ver reivindicaciones 1-15)

El documento D01 divulga la inhibición de la replicación del VIH mediante la interrupción de la proteína precursora para la formación de la cápside viral. (Ver resumen, descripción, párrafos 0111-0406 y tabla 1)

El documento D02 divulga los resultados genotipado del VIH a la resistencia a fármacos de muestras de plasma de baja carga viral. (Ver resumen, métodos y conclusiones)

El documento D03 publica el desarrollo de un nuevo agente anti-VIH: efecto quimérico Vpr que contiene residuos de proteasa en la replicación del virus. Los agentes quiméricos de proteínas virales y construcciones de ácidos nucleídos que los codifican son útiles como agentes terapéuticos. (Ver resumen,

1. NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/1986)

Tanto la secuencia nucleotídica SEQ ID NO:1 como la SEQ ID NO:2 no han sido divulgadas tal cual en el estado de la técnica, por lo que la invención según se recoge en las reivindicaciones 1-15 es nueva en el sentido del artículo 6.1 Ley 11/1986.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986)

El documento más próximo en el estado de la técnica es D01 y publica en la descripción del método, el uso de la secuencia SEQ ID NO:56 como precursor para la realización de una segunda PCR en el proceso de amplificación del gen *pol* del VIH (ver tabla 1). La secuencia indicada anteriormente tiene una identidad completa, ausencia de gaps y solapamiento de 24 de los 24 nucleótidos de la SEQ ID NO:1, sólo posee 2 nucleótidos adicionales más que la SEQ ID NO:1

El documento D02 publica el genotipado de ARN del VIH de muestras biológicas aisladas, plasma, de baja carga viral, 75 copias/ml, para determinar mutaciones de resistencia del VIH. Una de las secuencias usadas en el método descrito contiene la SEQ ID NO:2 con una identidad completa, ausencia de gaps y solapamiento de 23 de los 24 nucleótidos. (Ver resumen, métodos y conclusiones)

Tanto las etapas del método de detección precoz de VIH, como las de genotipado del VIH y el de detección precoz de mutaciones de resistencia del VIH no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar los métodos descritos, ya que son técnicas muy conocidas en el campo de la biología molecular. Además, el objeto de la invención es la amplificación del gen *pol* por lo que la invención provee de un método alternativo de detección precoz del VIH en muestras biológicas de baja carga viral (reivindicaciones 4-7 y 12-13) mediante la amplificación usando dos cebadores específicos que aportan la ventaja del uso de muestras biológicas de baja carga viral que ya ha sido usada para muestras de baja carga viral como en el D02.

Las secuencias divulgadas en los documentos D01 y D02 (ver reivindicación 1) se han usado para la amplificación del gen *pol* o bien son parte de una secuencia del gen, por lo que podría ser evidente para un experto en la materia el uso de estas secuencias como cebadores para amplificación del gen *pol*.

Consecuentemente, las reivindicaciones 1-15 carecen de actividad inventiva según el artículo 8.1 Ley 11/1986.