



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 294 589**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05008605 .7**

(86) Fecha de presentación : **20.04.2005**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1591539**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2005**

(54) Título: **Variación de la secuencia nucleósida de NS5A como marcador.**

(30) Prioridad: **29.04.2004 US 566274 P**

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(72) Inventor/es: **Ackrill, Andrew Michael;
Orle, Karina Anna y
Paterson, Morris**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Variación de la secuencia nucleósida de NS5A como marcador.

5 La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema sanitario importante en todo el mundo. Solamente en los Estados Unidos se estima que se infectan de manera crónica cuatro millones de personas con el VHC. El VHC, principal agente etiológico de la hepatitis de tipo diferente a hepatitis A o B se transmite mayoritariamente mediante transfusión de sangre infectada y productos derivados de la sangre (Cuthbert *et al.*, 1994, *Clin. Microbiol. Rev.* 7:505-532). Previamente a la introducción del cribado para detectar el VHC a mediados de la década de los noventa, el VHC correspondía al 80-90% de los casos de hepatitis tras una transfusión en los Estados Unidos. Se ha observado también una tasa elevada de infección por VHC en personas con trastornos hemorrágicos o insuficiencia renal crónica, grupos que se exponen frecuentemente al contacto con la sangre y productos derivados de ésta.

10 15 La infección aguda por el VHC da lugar a una replicación viral persistente y a una progresión hasta la hepatitis crónica en el 90% de los casos aproximadamente. La infección crónica por VHC resulta en un daño hepático progresivo y en el desarrollo de cirrosis en muchos pacientes. En pacientes con una infección crónica activa, puede aparecer una cirrosis en sólo dos años, aunque es más frecuente que lo haga en un periodo de 10 a 20 años. El daño hepático puede progresar hasta un carcinoma hepatocelular en el 30% al 50% de los pacientes que presentan VHC. Generalmente, el carcinoma hepatocelular es de aparición tardía y puede tardar en desarrollarse más de 30 años (Bisceglie *et al.*, 1995, *Semin. Liver Dis.* 15:64-69). La contribución relativa de factores virales o relativos al huésped en la progresión de la enfermedad no se ha dilucidado.

20 25 30 El VHC es un virus con envoltura que contiene un genoma compuesto por una cadena de RNA simple de polaridad positiva de aproximadamente 9,5 kb. El VHC ha sido clasificado como un género a parte en la familia *Flaviviridae* en base a la organización de su genoma y a las propiedades del virión, familia que incluye también pestivirus y flavivirus (Alter, 1995, *Semin. Liver Dis.* 15:5-14). El genoma viral consiste en una región no traducida 5' (UTR) extensa, un marco de lectura abierto largo que codifica un precursor de una poliproteína de 3011 aminoácidos aproximadamente y una UTR 3' de poca longitud. Las proteasas virales y del huésped escinden el precursor de la poliproteína para producir proteínas virales estructurales y no estructurales maduras. El VHC codifica dos proteinasas, una metaloproteinasa dependiente de zinc, codificada por la región NS2-NS3 y una serina proteinasa codificada en la región NS3/NS4. Estas proteinasas son necesarias para la escisión de regiones específicas de la poliproteína precursora en péptidos maduros. La mitad carboxilo de la proteína 5 no estructural, NS5B, contiene la RNA-polimerasa dependiente de RNA. La función de las proteínas no estructurales restantes, NS4B y las de NS5A (la mitad amino-terminal de la proteína 5 no estructural) siguen siendo desconocidas.

35 40 45 50 El interferón alfa (interferón) es un tratamiento aprobado por la Food and Drug Administration para su uso en la infección crónica causada por el VHC. Estos efectos del interferón son mediados a través de diferentes proteínas celulares inducibles, que incluyen la proteína cinasa activada por RNA de cadena doble (PKR) (Gale *et al.*, 1997, *Virology* 230:217-227). Solamente entre el 8% y el 12% de los pacientes con VHC de genotipo 1 presentan una respuesta clínica contra el virus sostenida al administrar el tratamiento con interferón (Carithers *et al.*, 1997, *Hepatology* 26:83S-88S; Lindsay, 1997, *Hepatology* 26:71S-77S). Recientemente, el tratamiento conjunto con interferón y ribavirina, análogo de la guanosina, demostró ser más eficaz que la monoterapia con interferón para producir respuestas bioquímicas y contra el virus sostenidas (Poynard *et al.*, 1998, *Lancet* 352:1426-1432). Sin embargo, a pesar de la mejora significativa de la respuesta sostenida en ratas, un 60% de pacientes que presentaban una infección con título elevado de VHC de genotipo 1 no respondían al tratamiento combinado. Por ejemplo, la tasa de respuesta en pacientes infectados con VHC-1b es inferior al 40%. También se ha informado de tasas de respuesta bajas similares en pacientes infectados con el genotipo prototípico de los Estados Unidos, VHC-1a (Mahaney *et al.*, 1994, *Hepatology* 20:1405-1411). Por el contrario, la tasa de respuesta en pacientes infectados con el genotipo 2 del VHC alcanza casi el 80% (Fried *et al.*, 1995, *Semin. Liver Dis.* 15:82-91.) La expresión de toda la poliproteína del VHC ha demostrado que inhibe la señalización inducida por interferón en las células U2-OS del osteosarcoma humano (Heim *et al.*, 1999, *J. Virol.* 73:8469-8475). No se dio a conocer cuál era la proteína del VHC causante de este efecto.

55 60 65 La relación que existe entre la respuesta a interferón y la secuencia no estructural 5 A (NS5A) del VHC es controvertida. La respuesta al tratamiento con interferón varía según los subtipos de VHC, siendo el subtipo VHC-1b particularmente resistente al tratamiento con interferón (Alter *et al.*, 1998, *MMWR Recomm. Rep.* 47 (RR-19):1-39). Una comparación entre la secuencia del ácido nucleico completo del VHC perteneciente a virus resistentes a interferón y a virus sensibles a interferón procedentes de pacientes infectados con VHC manifestaban substituciones antisentido que correspondían al extremo carboxi del NS5A (Enomoto *et al.*, 1995, *J. Clin. Invest.* 96:224-230). La región de 40 aminoácidos correspondiente de la NS5A (aminoácidos 2209-2248 de la poliproteína del VHC) se ha denominado como la región determinante de la sensibilidad al interferón ISDR (Enomoto *et al.*, 1995). La ISDR se encuentra en una región de la proteína NS5A, la cual puede unirse e inhibir la función de la PKR (Gale *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 1998, 18:52085218). Enomoto *et al.* (1996, *N. Eng. J. Med.* 334:77-81) propusieron un modelo en el que los pacientes que respondían al tratamiento con interferón habían sido infectados con virus que presentaban substituciones múltiples en la ISDR (en comparación con la secuencia prototípica de VHC 1b-J resistente a interferón) mientras que pacientes en los que el tratamiento con interferón fracasaba habían sido infectados con virus con pocas substituciones en la ISDR.

Nousbaum *et al.*, Journal de Virology, Octubre del 2000, volumen 74, número 19, páginas 9028-9038, proporcionan indicios de fuerzas selectivas positivas que actúan sobre la variabilidad del gen NSSA durante tratamiento con IFN

y especialmente en el extremo C terminal. Los datos de este documento implican también que la resistencia viral mediada por NS5A puede involucrar a secuencias fuera de las regiones genómicas descritas frecuentemente en la técnica anterior (ISDR y sitio de unión a la PKR), es decir, el tramo de secuencia de 310 a 330. Sin embargo, no puede hallarse ninguna medida que proporcione indicios de la importancia del residuo 313 y de la substitución isoleucina por valina en el aumento de la probabilidad de éxito del tratamiento de la enfermedad con interferón. La técnica anterior, por lo tanto no identifica la importancia del residuo del aminoácido 313 y la substitución isoleucina/valina y por eso no anticipa la función técnica principal de la aplicación práctica subyacente.

De los 25 estudios que han publicado secuencias de la ISDR de virus resistentes a interferón y virus sensibles a

- 10 interferón, nueve corroboran el modelo Enomoto y concluyen que a un nivel de significancia del 5%, los datos proporcionan suficientes indicios de que la respuesta al interferón y las sustituciones en la ISDR son dependientes (Enomoto *et al.*, 1995, 1996; Chayama *et al.*, 1997, *Hepatology*, 25:745-749; Kurosaki *et al.*, 1997, *Hepatology* 25:750-753; Fukukawa *et al.*, 1998, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:412-418; Saiz *et al.*, 1998, *J. Infect. Dis.* 177:839-847; Murashima *et al.*, 1999, *Scand. J. Infect. Dis.* 31:27-32; Sarrazin *et al.* 1999, *J. Hepatol.* 30:1004-1013; Sakuma *et al.*, 1999, *J. Infect. Dis.* 180:1001-1009). Los otros 16 estudios no pudieron concluir que existiera una correlación (Hofgartner *et al.*, 1997, *J. Med. Virol.* 53:118-126; Khorsi *et al.*, 1997, *J. Hepatol.* 27:72-77; Squadrito *et al.*, 1997, *Gastroenterology* 113:567-572; Zeuzem *et al.*, 1997, *Hepatology* 25:740-744; Duverlie *et al.*, 1998, *J. Gen. Virol.* 79:1373-1381; Franguel *et al.*, 1998, *Hepatology* 28:1674-1679; Odeberg *et al.*, 1998, *J. Med. Virol.* 56:33-38; Pawlotsky *et al.*, 1998, *J. Virol.* 72:2795-2805; Polyak *et al.*, 1998, *J. Virol.* 72:4288-4296; Rispetter *et al.*, 1998, *J. Hepatol.* 29:352-361; Chung *et al.*, 1999, *J. Med. Virol.* 58:353-358; Sarrazin *et al.* 1999, *J. Hepatol.* 30:1004-1013; Squadrito *et al.*, 1999, *J. Hepatol.* 30:1023-1027; Ibarrola *et al.*, 1999, *Am. J. Gastroenterol.* 94:2487-2495; Mihm *et al.*, 1999, *J. Med. Virol.* 58:227-234; Arase *et al.*, 1999, *Intern. Med.* 38:461-466). De modo interesante, siete de los nueve estudios que confirman una correlación están basados en muestras aisladas de VHC procedentes de Japón, mientras que 15 de los 16 estudios que no respaldan la existencia de correlación están basados en muestras aisladas procedentes de Europa y
- 20 América del Norte. Aunque generalmente no se encuentra una correlación estadística significativa entre la respuesta a interferón y la secuencia ISDR en estudios norteamericanos y europeos existen indicios de que existe una relación. Cuando las clases de secuencias intermedias y mutantes de la ISDR de un estudio concreto se combinan, las tasas de respuesta al interferón son mayores a las de los pacientes con secuencias de la ISDR de tipo salvaje (Herion y Hoofnagle, 1997, *Hepatology* 25:769-771).

- 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
 - 65
- La presente invención se basa en el descubrimiento de que en sujetos humanos infectados con el subtipo VHC-1a, existe una asociación significativa entre las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de la posición 937 del gen de NS5A del VHC y la respuesta al tratamiento con interferón en la persona infectada. Específicamente, personas infectadas por los virus que contienen una "G" en la posición 937 del gen de la NS5A que da lugar a la presencia de valina en la posición 313 de la proteína NS5A, presentarán una probabilidad más elevada de que se produzca una respuesta sostenida contra el virus al administrar un tratamiento con interferón. Por otro lado, las personas infectadas con virus que contengan una "A" en la posición 937 del gen de la NS5A, que dé lugar a la presencia de isoleucina en la posición 313 de la proteína NS5A, tendrán una probabilidad más elevada de no presentar respuesta contra el virus al administrar un tratamiento con interferón. A nuestro entender, este hecho apunta a que por primera vez se ha asociado un nucleótido específico y una mutación de un aminoácido con la respuesta al tratamiento con interferón. Además, la posición de esta mutación particular no se encuentra en la ISDR o en el sitio de unión a la PKR de la proteína NS5A.

Consecuentemente, la presente invención proporciona métodos para predecir la respuesta al tratamiento con interferón en una persona infectada con VHC-1a. En un modo de realización, el método proporciona el polinucleótido del VHC-1a procedente de la persona, que comprende una porción que contiene el nucleótido de la posición 937 del gen de la NS5A y la determinación de si el nucleótido en la posición 937 es "G" o no lo es, en el que la presencia de una "G" en la posición 937 indica una probabilidad más elevada de que la persona presente una respuesta sostenida contra el virus al administrar un tratamiento con interferón. En otro modo de realización, el método proporciona el polipéptido del VHC-1a de una persona que comprende una porción que contiene el aminoácido de la posición 313 de la proteína NS5A y la determinación de si el aminoácido de la posición 313 es valina o no lo es, en el que la presencia de valina en la posición 313 indica una probabilidad más elevada de que la persona presente una respuesta sostenida contra el virus al administrar un tratamiento con interferón.

La presente invención proporciona también métodos para el tratamiento de personas infectadas con el VHC. En un modo de realización, el método proporciona el polinucleótido de VHC-1a procedente de una persona que comprende una porción que contiene el nucleótido de la posición 937 del gen de la NS5A, la determinación de si el nucleótido en la posición 937 es "G" o no lo es y si el nucleótido en la posición 937 es "G", el tratamiento de la persona con interferón. En otro modo de realización, el método proporciona un polipéptido del VHC-1a procedente de una persona, que comprende una porción que contiene el aminoácido de la posición 313 de la proteína NS5A y la determinación de si el aminoácido de la posición 313 es valina o no lo es y si el aminoácido de la posición 313 es valina, el tratamiento de la persona con interferón.

La presente invención proporciona también el empleo de interferón para la preparación de un medicamento para

- el tratamiento de una nueva población de pacientes. En un modo de realización, la utilización comprende el empleo de interferón para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una persona infectada con el VHC, en el que dicha persona infectada con el VHC el nucleótido de la posición 937 del gen de la NS5A de un polinucleótido del VHC-1a es una G. En otro modo de realización, la utilización comprende el empleo de interferón para la preparación

ES 2 294 589 T3

de un medicamento para el tratamiento de una persona infectada con el VHC, en el que dicha persona infectada con el VHC, el aminoácido de la posición 313 de la proteína NS5A de un VHC-1a es valina.

En un modo de realización preferido de los usos anteriores el interferón se selecciona del grupo formado por 5 Roferon®-A, Pegasys®, Intron® A y Peg-Intron®.

La presente invención proporciona también un oligonucleótido que puede utilizarse para detectar una substitución de nucleótidos en la posición 937 en el gen de la NS5A del VHC-1a. En los modos de realización preferidos, el oligonucleótido posee una longitud que oscila entre 14 y 35 nucleótidos y es básicamente complementario a cualquiera 10 de las cadenas en una región del gen de la NS5A que contiene la posición 937. La presente invención proporciona además un equipo que es útil para predecir la respuesta a interferón en una persona infectada con el VHC-1a. Específicamente, el equipo comprende un oligonucleótido que puede utilizarse para detectar una substitución de nucleótidos 15 en la posición 937 en el gen de la NS5A del VHC-1a, en el que el oligonucleótido posee una longitud que oscila entre 14 y 35 nucleótidos y es básicamente complementario a cualquiera de las cadenas en una región del gen de la NS5A que contiene la posición 937, y una polimerasa.

Las ventajas y características siguientes de la invención, entre otras y la manera con la cual se llevan a cabo serán más obvias al considerar conjuntamente la siguiente descripción detallada de la invención y los ejemplos que la acompañan, que ilustran modos de realización ejemplares.

20 La frase “nucleótido de la posición 937 del gen de la NS5A” significa el locus en la posición de nucleótido 937 del cDNA o RNA de la NS5A del VHC-1a con la secuencia que se muestra en el ID de SEC Núm:1 como la secuencia de referencia para la alineación, en la que el ID de SEC Núm:1 representa la región codificante de la NS5A, entre las posiciones de nucleótidos 6264 y 7601 de la secuencia de nucleótidos del genoma del VHC-1a del GenBank con el 25 número de accesión M67463.

La frase “aminoácido en la posición 313 de la proteína NS5A” significa el aminoácido de la posición 313 de la proteína NS5A del VHC-1a con la secuencia que se muestra en el ID de SEC Núm:2 como secuencia de referencia para la alineación, en la que ID de SEC Núm:2 representa la secuencia polipeptídica que corresponde a la proteína 30 NS5A y que comprende el tramo desde el aminoácido de la posición 1975 al aminoácido de la posición 2420 de la poliproteína del genoma del VHC-1a del GenBank con número de accesión P26662.

Los términos “substitución(es) de nucleótidos” y “variación(es) de nucleótido” se usan en este documento indistintamente y se refieren a cambio(s) entre nucleótidos en una posición en la secuencia de nucleótidos de referencia de 35 un gen concreto.

Los términos “mutación del aminoácido” y “substitución del aminoácido” se usan en este documento indistintamente para referirse a un cambio en un aminoácido en una posición en una secuencia de referencia de una proteína, que resulta de la substitución de un nucleótido o la variación en la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica 40 la proteína de referencia.

El término “determinación del genotipo” significa la determinación de el(los) nucleótido(s) en un locus concreto del gen.

45 El término “respuesta” al tratamiento con interferón es una respuesta deseable a la administración de un fármaco. Los términos “respuesta sostenida contra el virus” y “remisión completa” al tratamiento con interferón se usan en este documento indistintamente y se refieren a la ausencia de RNA del VHC en la muestra de un sujeto infectado, detectable mediante RT-PCR, ambos al final del tratamiento y 24 semanas después de la finalización del tratamiento. Los términos “ausencia de respuesta contra el virus” y “sin respuesta” al tratamiento con interferón se usan en este 50 documento indistintamente y se refieren a la presencia de RNA del VHC en la muestra de un sujeto infectado detectable mediante RT-PCR durante el tratamiento y al finalizar el tratamiento.

55 Los términos “muestra” o “muestra biológica” se refieren a una muestra de tejido o fluido aislado de un individuo, que incluye, pero no se limita a éstos, por ejemplo, biopsia, plasma, suero, sangre, líquido cefalorraquídeo, linfa, secciones externas de la piel, del aparato respiratorio, del intestino y del aparato genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, órganos. Se incluyen también muestras de constituyentes celulares de cultivos *in vitro* (que incluyen, pero no se limitan a éstos, medio acondicionado que se obtiene del crecimiento de células en el medio de cultivo, células supuestamente infectadas con virus, células recombinantes y componentes celulares).

60 Los términos “interferón” e “interferón alfa” se usan en este documento indistintamente y se refieren a la familia de proteínas específicas de especie altamente homólogas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular y modular la respuesta inmunitaria. Los interferones típicos adecuados incluyen, pero no se limitan a éstos, interferón recombinante alfa-2b como el interferón Intron® A comercializado por Schering Corporation, Kenilworth, N.J., interferón recombinante alfa-2a como el interferón Roferon®-A comercializado por Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J., interferón recombinante alfa-2C como el interferón Berofor® alfa 2 comercializado por Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn., interferón alfa-n1, una mezcla purificada de interferones alfa naturales como Sumiferon® comercializado por Sumitomo, Japón o como el interferón alfa-n1 Wellferon® (INS) comercializado por Glaxo-Wellcome Ltd., Londres, Gran Bretaña, o interferón alfa consenso tal como los que se describen en las patentes

ES 2 294 589 T3

estadounidenses Núm. 4 897 471 y 4 695 623 (especialmente los ejemplos 7, 8 o 9 de estas) y el producto específico comercializado por Amgen, Inc., Newbury Park, Calif. o el interferón alfa-n3, una mezcla de interferones alfa naturales creada por Interferon Sciences y comercializada por Purdue Frederick Co., Norwalk, Conn., bajo el nombre comercial Alferon. Se prefiere el uso de interferón alfa-2a o alfa-2b.

5

El término "interferón alfa pegilado" como se usa en este documento significa conjugados modificados de interferón alfa con polietilenglicol, preferiblemente interferón alfa-2a y alfa-2b. Los interferones alfa pegilados típicos adecuados incluyen, pero no se limitan a éstos, Pegasys® y Peg-Intron®.

10 Como se utilizan en este documento, los términos "ácido nucleico", "nucleótido", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a cebadores, sondas, fragmentos oligómeros detectables, controles oligómeros y oligómeros de bloqueo sin marcar y deberían ser genéricos a los polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), a los polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y a cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido de una base purina o pirimidina o de base purina o pirimidina modificadas.

15

Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede presentar enlaces fosfodiéster o enlaces modificados tales como fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, puente fosforamidato, puente fosfonato de metileno, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, puente fosforotioato o enlaces sulfona y combinaciones de éstos enlaces.

20

Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido puede estar formado por las cinco bases de origen biológico (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o otras bases distintas a las cinco bases de origen biológico. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención podría contener al menos una base modificada que se seleccione del grupo que incluye, aunque no se limita a éstos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracilo-5-oxiacétato de metilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinilpirimidina.

Además, un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido puede estar formados por una o varias estructuras de azúcares modificados tales como arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

35

No se pretende que la presente invención quede limitada por la fuente de ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido puede proceder de humanos u otros mamíferos o cualquier otro organismo o puede derivar de cualquier fuente recombinante, sintetizarse *in vitro* o mediante síntesis química. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido puede ser DNA, RNA, cDNA, DNA-RNA, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA), un híbrido o cualquier mezcla del mismo y puede existir en forma de cadena doble, cadena simple o en cadena doble parcialmente. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen los ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, en forma purificada o sin purificar, que incluyen genes, cromosomas, plásmidos, los genomas de material biológico como los microorganismos, p.ej., bacterias, levaduras, virus, viroides, moho, hongos, plantas, animales, humanos y similares.

45

No se pretende hacer distinción según su longitud entre los términos ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido y oligonucleótido y estos términos se usarán indistintamente. Estos términos incluyen DNA de cadena doble y simple, así como RNA de cadena doble y simple.

50

"Correspondiente" significa idéntico o complementario a una secuencia designada.

Ya que los mononucleótidos pueden hacerse reaccionar para producir oligonucleótidos de tal manera que el fosfato 5' de un anillo de pentosa de un mononucleótido se une al oxígeno 3' del próximo mediante un enlace fosfodiéster en una dirección, se hace referencia al final de un oligonucleótido como el "extremo 5'" si su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa del mononucleótido y como el "extremo 3'" si su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de un anillo de pentosa del mononucleótido subsiguiente. Como se utilizan en este documento, una secuencia de ácido nucleico, incluso si se encuentra en el dentro de un oligonucleótido mayor, puede decirse también que posee extremos 5' y 3'.

60

Cuando se trata de dos oligonucleótidos diferentes que no se solapan y que se hibridan con regiones diferentes de la secuencia del mismo ácido nucleico lineal complementaria y el extremo 3' de un oligonucleótido apunta hacia el extremo 5' del otro, el precedente oligonucleótido puede denominarse "en dirección 5'" y el siguiente el oligonucleótido "en dirección 3'".

65

El término "cebador" puede referirse a más de un cebador o una mezcla de cebadores y se refiere a un oligonucleótido, ya sea de aparición natural, como en una digestión con enzimas de restricción purificada o producidos sintéticamente, el cual es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de polinucleótido a lo largo de una cadena complementaria al colocarse en condiciones en las que se cataliza la síntesis de un producto de extensión del

ES 2 294 589 T3

cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico. Tales condiciones incluyen normalmente la presencia de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato diferentes y un agente que produzca la polimerización como la DNA polimerasa o la transcriptasa inversa, con un tampón adecuado ("tampón" comprende substituyentes que son cofactores o que afectan al pH, la fuerza iónica, etc.) y a una temperatura adecuada. El cebador es preferiblemente de cadena simple para lograr una eficiencia máxima en la amplificación.

El complemento de una secuencia de ácido nucleico como se usa en este documento se refiere a un oligonucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácido nucleico de modo que el extremo 5' de una secuencia se aparea con el extremo 3' del otro está en "asociación antiparalela". Ciertas bases que no se encuentran frecuentemente en los ácidos nucleicos naturales pueden aparecer en los ácidos nucleicos de la presente invención e incluyen, por ejemplo, inosina, 7-deazaguanina y las que se han tratado en el documento anteriormente. No es necesario que la complementariedad sea perfecta; las cadenas dobles estables pueden contener pares de bases desapareadas o bases sin aparear. Los expertos en las tecnologías de vanguardia sobre ácidos nucleicos pueden determinar la estabilidad de las cadenas dobles empíricamente considerando diferentes variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y la secuencia del oligonucleótido, fuerza iónica y la incidencia de pares de bases desapareadas.

Como se utilizan en este documento, el término "sonda" hace referencia a un oligonucleótido que puede formar una estructura de cadena doble con una región de un ácido nucleico, gracias a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en la región y es susceptible de ser detectada. La sonda, preferiblemente, no contiene una secuencia complementaria a la(s) secuencia(s) del cebador en una reacción de la nucleasa 5'. Como se trata posteriormente, la sonda puede estar marcada o sin marcar. El extremo 3' de la sonda puede estar "bloqueado" para impedir la incorporación de la sonda en un producto de extensión del cebador. El "bloqueo" puede conseguirse utilizando bases no complementarias o mediante la adición de un grupo químico como la biotina o un grupo al hidroxilo 3' del último nucleótido, que puede tener dos finalidades según el grupo que se seleccione, al actuar como un marcador para la detección subsiguiente o para recoger el ácido nucleico unido al marcador. El bloqueo puede conseguirse también mediante la extracción del OH 3' o mediante el empleo de un nucleótido que carezca de un OH 3' tal como un didesoxinucleótido.

El término "marcador" como se usa en este documento se refiere a cualquier átomo o molécula que puede utilizarse para proporcionar una señal detectable (cuantificable opcionalmente) y que puede estar unido a un ácido nucleico o proteína. Los marcadores pueden proporcionar señales detectables mediante fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción o absorción con rayos X, magnetismo, actividad enzimática y similares. Los marcadores convenientes para la presente invención incluyen los que facilitan la detección de fragmentos del tamaño de un oligonucleótido.

En ciertos modos de realización de la invención, el "marcador" es un colorante fluorescente. Los marcadores fluorescentes pueden comprender colorantes que poseen carga negativa, como los colorantes de la familia de las fluoresceínas o colorantes que poseen carga neutra, como los colorantes de la familia de la rodamina o colorantes que presenten carga positiva, como los colorantes de la familia de la cianina. Los colorantes de la familia de la fluoresceína incluyen, p.ej., FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Los colorantes de la familia de la rodamina incluyen Texas Red, ROX, R110, R6G, y TAMRA. Los FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, y TAMRA están comercializados por Perkin-Elmer (Foster City, Calif.) y el Texas Red está comercializado por Molecular Sondas, Inc. (Eugene, OR). Los colorantes de la familia de la cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy5, y Cy7 y los comercializa Amersham (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

El término "colorante inhibidor" como se usa en este documento se refiere a un grupo químico que absorbe energía emitida por un colorante fluorescente, por ejemplo, cuando el colorante inhibidor y el colorante fluorescente están unidos al mismo polinucleótido. El colorante inhibidor puede reemitter la energía absorbida por un colorante fluorescente en una señal característica para este colorante inhibidor y de este modo un colorante inhibidor puede también ser un "marcador". Este fenómeno se conoce generalmente como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o FRET. Alternativamente, un colorante inhibidor puede disipar la energía absorbida por un colorante fluorescente en forma de calor. Las moléculas utilizadas normalmente en la FRET incluyen, por ejemplo, fluoresceína, FAM, JOE, rodamina, R6G, TAMRA, ROX, DABCYL y EDANS. El hecho de que el colorante fluorescente sea un marcador o un colorante inhibidor viene definido por su espectro de excitación y emisión y el colorante fluorescente con el que se empareje. Por ejemplo, FAM se excita más eficientemente con luz de una longitud de onda de 488 nm y emite luz con un espectro de 500 nm a 650 nm, y un máximo de emisión de 525 nm. El FAM es un marcador donador adecuado para utilizarse con, p.ej., TAMRA como colorante inhibidor, el cual posee un máximo de excitación de 514 nm. Los colorantes inhibidores no fluorescentes ejemplares que disipan energía que absorben de un colorante fluorescente incluyen el colorante inhibidor Black Hole Quenchers™ comercializado por Biosearch Technologies, Inc. (Novato, Calif.).

Como se define en este documento, "actividad nucleasa 5' a 3'" se refiere a la actividad de una polimerasa de ácido nucleico específico de molde que comprende bien una actividad exonucleasa 5'a 3' tradicionalmente asociada con algunas DNA-polimerasas, gracias a la que los nucleótidos se extraen del extremo 5' de un oligonucleótido de manera secuencial (p.ej., DNA-polimerase 1 de *E. coli* posee esta actividad mientras que el fragmento Klenow no la tiene) o una actividad endonucleasa 5' a 3', gracias a la que tiene lugar la escisión de más de un enlace fosfodiéster (nucleótido) a partir del extremo 5' o ambas. Aunque no se pretende acogerse a una teoría en concreto, el sustrato preferido para la escisión dependiente de la actividad endonucleasa 5' a 3' sobre un complejo de hibridación sonda-molde es una cadena simple de ácido nucleico desplazada, con estructura en forma de horquilla, con la hidrólisis del

ES 2 294 589 T3

enlace fosfodiéster que une la región desplazada con la porción de bases apareadas de la cadena, como se describe en Holland *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-80, incorporado en este documento mediante su referencia completa.

5 El término “adyacente” como se usa en este documento se refiere a la posición del cebador con respecto a la sonda sobre su cadena complementaria de ácido nucleico molde. El cebador y la sonda pueden estar separados por más de 20 nucleótidos, por de 1 a 20 nucleótidos aproximadamente, más preferiblemente, de 1 a 10 nucleótidos aproximadamente o pueden estar el uno al lado del otro, como sea deseable para su detección mediante un proceso independiente de polimerización. Alternativamente, para su uso en el proceso dependiente de polimerización, como
10 10 cuando el presente método se utilizó en una amplificación mediante PCR y los métodos de detección son los que se muestran aquí, la “adyacencia” puede presentarse en cualquier parte en la secuencia que se amplifica, en cualquier posición en dirección 3’ del primer de modo que la extensión del primer posicionará la polimerasa de tal manera que se produzca la escisión de la sonda.

15 Como se utiliza en este documento, el término “polimerasa de ácido nucleico termoestable” se refiere a una enzima que es relativamente estable al calor en comparación, por ejemplo, con polimerasas de nucleótidos procedentes de *E. coli* y que catalizan la polimerización de nucleósidos trifosfato. Generalmente, las enzimas iniciarán la síntesis en el extremo 3’ del cebador hibridado con la secuencia diana y continuará la síntesis de una nueva cadena hacia el extremo 5’ del molde, y si poseyera una actividad nucleasa 5’ a 3’, seguiría con un intermedio de hidrólisis, hibridación de
20 20 la sonda para liberar fragmentos de sonda marcados y sin marcar hasta que la síntesis terminara o los fragmentos de sonda desaparecieran de la secuencia diana. En la patente estadounidense núm. 4 889 818 se describe una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus* (*Taq*) y en Saiki *et al.*, 1988, *Science* 239:487-91 se describe un método para su uso en PCR convencional.

25 La *DNA-polimerasa Taq* tiene una actividad exonucleasa 5’-3’ de reemplazo en la cadena de DNA pendiente de síntesis y sustitución de cadenas. Véase, Gelfand, “*Taq DNA polymerase*” in *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification*, Erlich, Ed., Stockton Press, N.Y. (1989), capítulo 2. En solución, se produce poca degradación de las sondas, en caso de que se produzca.

30 El término “reacción de la nucleasa 5’” de un ácido nucleico, cebador y sonda se refiere a la degradación de una sonda hibridada al ácido nucleico cuando el cebador se extiende gracias a una polimerasa de ácido nucleico con actividad nucleasa 5’ a 3’, como se describe más detalladamente más adelante. Tales reacciones se basan en las descritas en las patentes estadounidenses núm: 6 214 979, 5 804 375, 5 487 972 y 5 210 015 que se incorporan en este documento mediante la referencia completa.

35 35 El término “ácido nucleico diana” se refiere a un ácido nucleico que puede hibridarse con un cebador y una sonda en una reacción de la nucleasa 5’ y contiene uno o varios sitios de variación de nucleótidos.

Los términos “estrictas” o “condiciones estrictas”, como se utilizan en este documento, indican condiciones de hibridación de baja fuerza iónica y temperatura elevada, como bien se conoce en la materia. Véase, p.ej., Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, ed., J. Wiley & Sons Inc., New York, 1988); Tijssen, 1993, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” en *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Hybridization with nucleic acid probes* (Elsevier), cada uno de ellos incorporado mediante referencia. Generalmente, las condiciones estrictas que se seleccionan se encuentran entre aproximadamente 5-30°C por debajo del punto de fusión (T_f) para la secuencia que se especifica a una fuerza iónica y pH definidos. Alternativamente, las condiciones estrictas se seleccionan que estén 5-15°C por debajo de la T_f para la secuencia especificada a una fuerza iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (a una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidas) en la que el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en estado de equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, en la T_f , el 50% de las sondas se encuentran ocupadas en estado de equilibrio). Por ejemplo, las condiciones de hibridación estrictas serán aquellas en las que la concentración de sales sea inferior a 1,0 M de ión sodio aproximadamente (u otras sales), normalmente 0,01 M hasta 1 M de concentración de ión sodio aproximadamente a pH 7,0 hasta pH 8,3 aproximadamente y la temperatura es al menos 25°C aproximadamente para sondas de pequeña longitud (p.ej., de 10 a 50 nucleótidos) y al menos 55°C aproximadamente para sondas de longitud elevada (p.ej., superior a 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas pueden modificarse también mediante la adición de agentes desestabilizadores de la hibridación como la formamida. Unas condiciones no estrictas ejemplares o poco estrictas para una sonda de longitud elevada (p.ej., superior a 50 nucleótidos) comprenderán un tampón de Tris 20 mM, pH 8,5, KCl 50 mM, y MgCl₂ 2 mM y una temperatura de reacción de 25°C.

60 La práctica de la presente invención utilizará a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología e ingeniería genética del DNA, por los expertos en la materia. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, p.ej., Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, 1984); y una serie, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.).

ES 2 294 589 T3

La secuencia de nucleótidos del genoma completo del VHC- la se encuentra disponible en el GenBank con el número de accesión M67463 y la región codificante de la NS5A entre los nucleótidos de las posiciones 6264 y 7601se proporciona como el ID de SEC núm:1. La substitución de un único nucleótido descubierta recientemente tiene lugar en la posición 937. La substitución G937A corresponde a un cambio en el aminoácido codificado de valina a isoleucina.

5 Se conocen varias técnicas en el ámbito para la detección de nucleótidos o variaciones de aminoácidos y todas ellas pueden utilizarse para poner en práctica los métodos de la presente invención. El método concreto que se utiliza para identificar la variación en la secuencia no es un aspecto crítico para la invención. Aunque si se considera la puesta en práctica, el coste y la comodidad habrá métodos más convenientes que otros, está claro que cualquier método 10 que pueda identificar el nucleótido de la posición 937 de ID de SEC núm:1 o el aminoácido en la posición 313 de ID de SEC núm:2 proporcionarán la información necesaria para poner en práctica la invención. Las técnicas pueden estar basadas en polinucleótidos o en proteínas. En cualquier caso, las técnicas utilizadas deben ser suficientemente sensibles para detectar de manera exacta variaciones de un único nucleótido o variaciones de aminoácidos.

15 En un método de detección basado en polinucleótidos, la determinación del genotipo se realiza mediante la identificación del nucleótido presente en el sitio de substitución, nucleótido de la posición 937de ID de SEC núm:1. Cualquier tipo de muestra biológica procedente de un individuo infectado con el VHC-1a que contiene polinucleótido VHC-1un puede utilizarse para determinar el genotipo. La determinación del genotipo puede llevarse a cabo mediante el aislamiento de RNA del VHC utilizando métodos de extracción de RNA estándares conocidos en la materia. La amplificación de RNA puede realizarse mediante primero la transcripción inversa del RNA diana utilizando, por ejemplo, una transcriptasa inversa viral y seguida de la amplificación del cDNA resultante, o usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa combinada con una temperatura elevada (RT-PCR), como se describe en las patentes estadounidenses núm: 5 310 652; 5 322 770; 5 561 058; 5 641 864; y 5 693 517; cada una de ellas incorporada en este documento mediante referencia (véase también Myers y Sigua, 1995, en *PCR Strategies, supra*, capítulo 25 5). Variedad de métodos se conocen en el ámbito para la identificación de nucleótidos presentes en una posición de nucleótido concreta.

El nucleótido en la posición 937puede identificarse mediante métodos de secuenciación del DNA, como el método de terminación de cadenas (Sanger *et al.*, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467, incorporado en este documento mediante su referencia), que son bien conocidos en el ámbito. En un modo de realización, se amplifica una subsecuencia del gen que contiene el sitio de sustitución y se clona en un plásmido adecuado y después se secuencia o se secuencia directamente. La secuenciación basada en la PCR se describe en la patente estadounidenses núm. 5 075 216; Brow, en *PCR Protocols*, 1990, (Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego), capítulo 24; y Gyllensten, en *PCR Technology*, 1989 (Erlich, ed., Stockton Press, New York), capítulo 5; cada una incorporada en este documento mediante referencias. Normalmente, la secuenciación se lleva a cabo utilizando un secuenciador automático comercializado, por ejemplo, por PE Biosystems (Foster City, Calif.), Pharmacia (Piscataway, N.J.), Genomyx Corp. (Foster City, Calif.), LI-COR Biotech (Lincoln, Nebr.), GeneSys technologies (Sauk City, Wis.) y Visable Genetics, Inc. (Toronto, Canada).

40 El nucleótido en la posición 937 puede identificarse mediante métodos para la determinación del genotipo basados en la amplificación. Se han descrito una variedad de métodos de amplificación de ácidos nucleicos y pueden utilizarse en ensayos que detecten cambios de una sola base en un ácido nucleico diana. Un método preferido es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se conoce bien en el ámbito y se describe en las patentes estadounidenses núm. 4 683 195; 4 683 202; y 4 965 188; cada una de ellas incorporada en este documento mediante referencia. Pueden encontrarse ejemplos de numerosos artículos publicados que describen los métodos y aplicaciones de la PCR 45 en *PCR Applications*, 1999, (Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego), *PCR Strategies*, 1995, (Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego); *PCR Protocols*, 1990, (Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego); y *PCR Technology*, 1989, (Erlich, ed., Stockton Pre Nueva York); cada uno de ellos incorporado en este documento mediante referencias. Los proveedores como PE Biosystems (Foster City, Calif.) comercializan los reactivos para la PCR y publican los 50 protocolos de la PCR.

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (Wu y Wallace 1988, *Genomics* 4:560-569); el ensayo de desplazamiento de cadena (Walker *et al.*, 1992, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 89:392-396, Walker *et al.* 1992, *NucleicAcids Res.* 20:1691-1696, y la patente estadounidense núm. 5 455 166); y varios sistemas de amplificación basados en la transcripción que incluyen los métodos descritos en las patentes estadounidenses núm. 5 437 990; 5 409 818; y 5 399 491; el sistema de amplificación de transcripción (TAS) (Kwoh *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177); y replicación autosustentable de secuencias (3SR) (Guatelli *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878 y WO 92/08800); cada una de ellas incorporada en este documento mediante referencia. Alternativamente, pueden utilizarse métodos que amplifican la sonda hasta niveles detectables, como la amplificación con replicasa Q β (Kramer y Lizardi, 1989, *Nature* 339:401-402, y Lomeli *et al.*, 1989, *Clin. Chem.* 35:1826-1831, 60 ambos incorporados en este documento mediante referencias). Se proporciona una revisión de los métodos de amplificación conocidos en Abramson y Myers, 1993, *Current Opinion in Biotechnology* 4:41-47, incorporados en este documento mediante referencias.

El nucleótido en la posición 937 se puede identificar utilizando amplificaciones específicas de secuencia o métodos de extensión del cebador, que se basan en el efecto inhibidor de un desapareamiento terminal del cebador sobre la acción de la DNA-polimerasa para extender el cebador. Para detectar una secuencia utilizando una amplificación específica de secuencia o un método basado en la extensión, se escoge un cebador complementario al gen de la NS5A de modo que el nucleótido 3' terminal se hibrida en la posición de substitución. En presencia de la variante específica

a identificar, el cebador se empareja a la secuencia diana en el extremo 3' y el cebador se extiende. En ausencia de la variante específica, el cebador posee un desapareamiento 3' en relación con la secuencia diana y la extensión del primer o bien se elimina o se reduce significativamente. La amplificación específica de alelo o los métodos basados en la extensión se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense núm. 5 137 806; 5 595 890; 5 639 611; y 5 en la patente estadounidense núm 4 851 331, cada una de ellas incorporada en este documento mediante referencias. Si se utiliza la determinación del genotipo basada en la amplificación específica de secuencia la identificación de la substitución requiere sólo la detección de la presencia o ausencia de la secuencia diana amplificada. Los métodos para la detección de la secuencia diana amplificada son bien conocidos en el ámbito. Por ejemplo, la electroforesis en gel (véase Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.) y los ensayos de hibridación de la sonda que se han descrito anteriormente se han utilizado ampliamente para la detección de la presencia de ácidos nucleicos.

10

Un método alternativo sin sonda, al que se hace referencia aquí como PCR en tiempo real, en la que la generación de ácido nucleico amplificado se detecta mediante la determinación del aumento de DNA de cadena doble en la mezcla de reacción se describe en Higuchi *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10:413-417; Higuchi *et al.*, 1993, *Bio/Technology* 11:1026-1030; Higuchi y Watson, en PCR Applications, *supra*, Capítulo 16; Patente estadounidense núm. 5,994,056; y números de publicación de patente europea: 487 218 y 512 334, cada uno de ellos incorporado en este documento mediante referencias. La detección de DNA diana de cadena doble se basa en el aumento de fluorescencia que el bromuro de etidio (EtBr) y otros colorantes emiten al unirse al DNA de cadena doble. El aumento del DNA de cadena doble que se obtiene de la síntesis de las secuencias diana da lugar a un aumento en la cantidad de colorante unido al 15 DNA de cadena doble y a un aumento en la cantidad de fluorescencia concomitante. En la determinación del genotipo en la que se utilizan métodos de PCR en tiempo real, las reacciones de amplificación se realizaron utilizando un par de cebadores específicos para uno de los alelos, de modo que cada amplificación pueda indicar la presencia de un alelo concreto. El genotipo de la muestra puede determinarse al realizar dos amplificaciones, una en la que se usan 20 cebadores específicos para la G en la posición 937 y otra que utiliza cebadores específicos para la A en la posición 937.

25

El nucleótido en la posición 937 se puede identificar utilizando métodos basados en sondas, en los que se cuenta con la diferencia de estabilidad de las cadenas dobles hibridadas que se forman entre la sonda y las variantes de nucleótidos que difieren en el grado de complementariedad. En condiciones de hibridación suficientemente estrictas, las cadenas dobles se forman sólo entre la sonda y la diana que se empareje con esta de forma exacta. La presencia de cadenas dobles de hibridación estables puede detectarse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos. Generalmente, se prefiere amplificar el ácido nucleico previamente a la hibridación para facilitar la detección. Sin embargo, no es necesario si se puede obtener ácido nucleico suficiente sin realizar una amplificación.

30

35 En algunos modos de realización, el nucleótido presente en la posición 937 se identifica mediante hibridación en condiciones de hibridación específicas de secuencia con una sonda oligonucleótida exactamente complementaria a la región del gen de la NS5A que contiene la posición 937. La secuencia de hibridación de la sonda y las condiciones de hibridación específicas de secuencia se seleccionan de manera que un único desapareamiento en el sitio de substitución desestabiliza la cadena doble de hibridación de modo suficiente para que no se forme efectivamente. Por lo tanto, en 40 condiciones de hibridación específicas de secuencia, las cadenas dobles estables se formarán sólo entre la sonda y la secuencia exactamente complementaria. Por esto, están dentro del alcance de la invención los oligonucleótidos de 14 a 60 nucleótidos de longitud, preferiblemente de 14 a 35 nucleótidos de longitud, que son complementarios exactamente a la región del gen de la NS5A que incluye la posición 937.

45 En otros modos de realización, el nucleótido presente en la posición 937 se identifica mediante la hibridación, en condiciones estrictas de hibridación suficientes, con un oligonucleótido básicamente complementario a la región del gen de la NS5A que incluye la posición 937. En este modo de realización, las condiciones de hibridación son menos estrictas de modo que permiten la formación de cadenas dobles estable con la secuencia diana, mientras que son suficientemente estrictas para descartar la formación de cadenas dobles estables con secuencias diferentes a la secuencia diana. Por lo tanto, están dentro del alcance de la invención los oligonucleótidos de 14 a 60 nucleótidos de longitud, preferiblemente de 14 a 35 nucleótidos de longitud, que son básicamente complementarios a la región del gen NS5A que contiene la posición 937.

55 El uso de oligonucleótidos básicamente complementarios, mejor que complementarios exactamente, puede ser conveniente en tipos de ensayos en los que la optimización de las condiciones de hibridación está limitada. Por ejemplo, en un tipo de ensayo típico de secuencias diana inmovilizadas con múltiples sondas, las sondas para cada diana se inmovilizan en un soporte sólido único. La hibridación se realiza simultáneamente poniendo en contacto el soporte sólido con una solución que contiene el DNA diana. Ya que todas las hibridaciones se realizan en condiciones idénticas, las condiciones de hibridación no se pueden optimizar por separado para cada sonda. La incorporación de desapareamientos en una sonda puede emplearse para ajustar la estabilidad de la cadena doble, cuando el tipo de ensayo descarta la posibilidad de ajustar las condiciones de hibridación. El efecto de la introducción de un desapareamiento concreto sobre la estabilidad de la cadena doble se conoce bien y la estabilidad de la cadena doble puede determinarse de manera estimada o empíricamente, como se ha descrito anteriormente.

60

65 Un oligonucleótido adecuado de la presente invención para su uso en métodos basados en sondas, que contiene una región de hibridación, ya sea básicamente complementaria o exactamente complementaria a la región diana de ID de SEC NÚM:1 o al complemento de ID de SEC NÚM:1, en el que la región diana contiene la posición 937, puede seleccionarse utilizando las sugerencias, bien conocidas en la materia, que se proporcionan en este documento. De

forma similar, las condiciones de hibridación adecuadas, que dependen del tamaño y de la secuencia de la sonda, se pueden seleccionar empíricamente utilizando las sugerencias, bien conocidas en la materia, que se proporcionan en este documento. El uso de sondas oligonucleótidas para detectar diferencias en el apareamiento de una sola base en la secuencia se describen en, por ejemplo, Conner *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282, y en la patente estadounidense núm. 5 468 613 y 5 604 099, cada una de ellas incorporada en este documento mediante referencia.

El cambio proporcional de la estabilidad entre una cadena doble de hibridación apareada perfectamente y otra en la que existe un desapareamiento de una sola base depende de la longitud de los oligonucleótidos hibridados. Las cadenas dobles formadas con sondas de secuencia corta se desestabilizan proporcionalmente en mayor grado con la presencia de un desapareamiento. En la práctica, los oligonucleótidos de entre 14 y 35 nucleótidos de longitud se prefieren en la detección específica de secuencia. Además, debido a que los extremos del oligonucleótido hibridado se someten a una disociación continua al azar y a rehibridación causada por la energía térmica, un desapareamiento en cualquiera de los extremos desestabiliza la cadena doble de hibridación en menor grado que un desapareamiento que ocurre en el interior. Preferiblemente, para la discriminación de un sólo cambio en un par de bases en la secuencia diana, se selecciona la secuencia de la sonda que hibride con la secuencia diana de modo que el sitio de substitución del nucleótido tenga lugar en la región interior de la sonda.

El criterio anterior de selección para la selección de una sonda que se hibride al ID de SEC NÚM:1 se aplica a la 20 región de hibridación de la sonda, es decir, a la parte de la sonda que está implicada en la hibridación con la secuencia diana. Una sonda puede estar unida a una secuencia de ácido nucleico adicional, como una cola de poli-T, que se utiliza para inmovilizar la sonda, sin que se alteren significativamente las características de hibridación de la sonda. Los expertos en la materia serán conocedores de que para su uso en los presentes métodos una sonda que esté unida a una secuencia de ácido nucleico adicional que no es complementaria a la secuencia diana y, por lo tanto, no participa 25 en la hibridación, es equivalente básicamente a una sonda que no esté unida. En los modos de realización preferidos de métodos basados en sondas para la determinación del genotipo de la NS5A, se amplifica una secuencia de ácido nucleico del gen de la NS5A que contiene el sitio de substitución y se hibrida a las sondas en condiciones estrictas de hibridación suficientes. La secuencia de nucleótidos se deduce a partir del patrón de unión de las sondas a la secuencia diana amplificada. En este modo de realización, la amplificación se realiza para proporcionar ácido nucleico suficiente 30 para su análisis mediante hibridación con sondas. Por lo tanto, los cebadores se designan de modo que se amplifique una región del gen de la NS5A que contiene el sitio de substitución independientemente de cual sea el nucleótido que esté presente en la muestra. La amplificación independiente de secuencia se consigue utilizando cebadores que hibriden con las regiones conservadas del gen de la NS5A.

Los tipos de ensayos para la detección de híbridos que se forman entre sondas y secuencias de ácidos nucleicos 35 en una muestra se conocen bien en el ámbito e incluyen el tipo de ensayo con la diana inmovilizada y los tipos que utilizan sonda inmovilizada. Estos tipos de ensayos están descritos en las patentes estadounidenses núm. 5 310 893; 5 451 512; 5 468 613; y 5 604 099; cada una de ellas incorporada en este documento mediante referencia. Además, las tecnologías con microchip o de análisis en micromatriz son aplicables también al método de detección basado 40 en sondas de la presente invención. Básicamente, en los microchips, se inmovilizan una gran cantidad de diferentes sondas oligonucleótidas en una matriz sobre un sustrato o vehículo, p.ej. un chip de silicio o una lámina de vidrio. Las secuencias de ácido nucleico diana que se analizan pueden ponerse en contacto con las sondas oligonucleótidas inmovilizadas en el microchip (Lipshutz *et al.*, 1995, *Biotechniques*, 19:442-445). Alternativamente, las múltiples 45 secuencias de ácido nucleico diana que se estudian se fijan sobre un substrato y las secuencias diana inmovilizadas se ponen en contacto con un conjunto de paneles de sonda (Drmanac *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology*, 16:54-58). Se han desarrollado un gran número de tecnologías de análisis con microchip que incorporan una o varias de las 50 técnicas descritas anteriormente para la detección de mutaciones de un único nucleótido. Las tecnologías de análisis con microchip, en combinación con herramientas de análisis informatizadas, permiten realizar cribados a gran escala. La adaptación de las tecnologías de análisis con microchip a la presente invención será más obvia para los expertos en la materia si se examinan la presente publicación (Wilgenbus *et al.*, 1999, *J. Mol. Med.*, 77:761-786).

Una técnica preferida para la determinación del genotipo basada en sondas para detectar para detectar substituciones de nucleótidos en la presente invención es la “reacción de la nucleasa 5’”, los modos de realización de la cual se describen en las patentes estadounidenses núm. 5 210 015; 5 487 972; y 5 804 375; y Holland *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7280, cada una de ellas incorporada en este documento mediante referencia. Los reactivos 55 e instrumentos utilizados para llevar a cabo la reacción de la nucleasa 5’ como el sistema COBAS TAQMANTM de Roche Diagnostics son conocidos por los expertos en la materia.

En resumen, en una reacción de la nucleasa 5’, se pone en contacto un ácido nucleico con un cebador y una sonda 60 en condiciones en las que el cebador y la sonda se hibridan con una cadena de ácido nucleico. El ácido nucleico, el cebador y la sonda se ponen también en contacto con una polimerasa de ácido nucleico con actividad nucleasa5’ a 3’. Las polimerasas de ácido nucleico que poseen actividad 5’ a 3’ pueden escindir la sonda hibridada con el ácido nucleico en dirección 3’ del cebador. El extremo 3’ del cebador proporciona el sitio de unión principal para la polimerasa de ácido nucleico. Cuando la polimerasa que está unida alcanza el extremo 5’ de la sonda, la polimerasa puede escindir fragmentos de la sonda.

El cebador y la sonda pueden designarse de modo que se hibriden en posiciones próximas en el ácido nucleico, 65 para que la unión de la polimerasa de ácido nucleico al extremo 3’ del cebador automáticamente la ponga en contacto

ES 2 294 589 T3

con el extremo 5' de la sonda. En este proceso, no se requiere la polimerización para colocar la polimerasa de ácido nucleico polimerasa en la posición para realizar la escisión. El término “escisión independiente de la polimerización” se refiere a este proceso.

5 Alternativamente, si el cebador y la sonda se hibridan en regiones distantes en el espacio del ácido nucleico, la polimerización debe suceder antes de que la polimerasa de ácido nucleico alcance el extremo 5' de la sonda. A medida que la polimerización continua, la polimerasa escinde progresivamente fragmentos del extremo 5' de la sonda. El proceso de escisión continua hasta que el resto de la sonda se ha desestabilizado hasta el punto en que se disocia de la molécula molde. El término “escisión dependiente de la polimerización” se refiere a este proceso.

10 Una ventaja del proceso de escisión independiente de la polimerización reside en que la amplificación del ácido nucleico no es necesaria. En ausencia de la extensión del cebador, el ácido nucleico es básicamente de cadena simple. Gracias a que el cebador y la sonda están unidos en posiciones adyacentes en el ácido nucleico, pueden generarse series 15 de hibridación de oligonucleótidos y escisión de fragmentos. Por lo tanto, se puede generar una cantidad suficiente de fragmentos, que permite su detección en ausencia de polimerización.

En cualquier proceso, se proporciona una muestra que contiene el ácido nucleico. El ácido nucleico que contiene la muestra puede primero transcribirse inversamente en cDNA, si es necesario y a continuación desnaturizarse, mediante cualquier método de desnaturización adecuado, que comprende métodos físicos, químicos o enzimáticos, conocidos por los expertos en la materia. Un método físico preferido para la separación de cadenas implica la aplicación de calor al ácido nucleico hasta lograr su completa desnaturización (>99%). La desnaturización típica mediante calor comprende temperaturas que oscilan entre 80°C aproximadamente hasta 105°C aproximadamente, para tiempos que oscilan entre 1 y 10 minutos. Como alternativa a la desnaturización, el ácido nucleico puede existir en forma de cadena simple en la muestra, como por ejemplo, en virus de RNA o virus de DNA de cadena simple.

25 La cadena de ácido nucleico desnaturizada se incuba entonces con un cebador y una sonda en condiciones de hibridación, condiciones que permiten la unión del cebador y la cadena de ácido nucleico. En algunos modos de realización, pueden usarse dos cebadores para amplificar el ácido nucleico. Como se conoce en la materia, los dos cebadores se seleccionan de modo que sus posiciones relativas a lo largo del ácido nucleico sean tales que el producto 30 de extensión sintetizado por un cebador, cuando el producto de extensión se separa de su molde (complemento), sirve como molde para la extensión del otro cebador para producir una réplica de la cadena de longitud definida.

Debido a que las cadenas complementarias poseen normalmente una longitud superior a la sonda o el cebador, las cadenas tienen más puntos de contacto y por lo tanto, mayor probabilidad de encontrarse en cualquier periodo de tiempo. Un exceso molar de sonda, más el cebador, ayuda a decantar el equilibrio hacia la hibridación del cebador y la sonda en vez de hacia la rehibridación del molde.

El cebador debe tener una longitud suficiente para propiciar la síntesis de productos de extensión en presencia 40 de un agente de polimerización. La longitud y composición exacta del cebador dependerá de varios factores, que comprenden la temperatura de la reacción de hibridación, el origen y fuente del cebador, la proximidad entre el sitio de hibridación de la sonda y el sitio de hibridación del cebador y la proporción de la concentración entre el cebador y la sonda. Por ejemplo, según la complejidad de la secuencia, el cebador oligonucleótido normalmente contiene entre 15 y 30 nucleótidos aproximadamente, aunque puede contener más o menos nucleótidos. Los cebadores deben ser 45 suficientemente complementarios para hibridarse selectivamente con sus cadenas respectivas y formar cadenas dobles estables.

Cada cebador puede seleccionarse de modo que sea “substantialmente” complementario a una cadena del ácido nucleico. No es necesario que los cebadores reflejen la secuencia exacta del molde, pero deben ser suficientemente complementarios para que se hibriden selectivamente a sus respectivas cadenas. Pueden intercalarse bases no complementarias o secuencias de mayor longitud en el cebador o en los extremos del cebador, siempre que el cebador mantenga una complementariedad suficiente con su cadena molde para formar una cadena doble estable con ella. Las secuencias de nucleótidos no complementarias de los cebadores pueden contener sitios reconocibles por las enzimas de restricción.

55 Para aumentar la probabilidad de que la sonda se haya hibridado a su ácido nucleico complementario antes de que la polimerización en la extensión del cebador alcance la región de cadena doble o antes de que la polimerasa se una al oligonucleótido en dirección 5' en el proceso independiente de la polimerización, pueden utilizarse una amplia variedad de técnicas. Las moléculas de cebador de poca longitud requieren generalmente temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el ácido nucleico. Por lo tanto, puede diseñarse una sonda de mayor longitud que el cebador para que la sonda se hibride preferiblemente al ácido nucleico a temperaturas superiores, en relación con la hibridación del cebador.

Pueden utilizarse también cebadores y sondas con una estabilidad térmica diferente. Por ejemplo, la composición de nucleótidos de la sonda puede seleccionarse de modo que posea un contenido de G/C superior y por consiguiente 65 mayor estabilidad térmica que el cebador. O por ejemplo, pueden incorporarse bases de DNA no convencionales en los cebadores o sondas para obtener una mayor o menor estabilidad térmica en comparación con cebadores o sondas que sólo contienen bases de DNA convencionales. Los parámetros de los ciclos térmicos pueden modificarse para beneficiarse de la estabilidad térmica diferencial de la sonda y el cebador. Por ejemplo, después de la fase de

desnaturalización en el ciclo térmico puede aplicarse una temperatura intermedia que permite que la sonda se una, pero impide que el cebador se una y entonces se reduce más la temperatura para permitir que el cebador se híbride y se extienda.

5 Preferiblemente, para favorecer la unión de la sonda antes que la del cebador puede utilizarse un exceso molar elevado de sonda en relación con la concentración de cebador. Tales concentraciones de sonda oscilan normalmente en una proporción de 2 a 20 veces superior, que la concentración del cebador respectivo, que es generalmente de $0,5 \times 10^{-7}$ M a 5×10^{-7} M.

10 Los cebadores y la sonda pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Los métodos para preparar oligonucleótidos de secuencia específica son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, la clonación y la restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los métodos de síntesis química pueden comprender, por ejemplo, el método fosfotriéster descrito por Narang *et al.*, 1979, *Methods in Enzymology* 68:90, el método fosfodiéster descrito por Brown *et al.*, 1979, *Methods in Enzymology* 68:109, el método deldietilfosforamidato presentado en 15 Beaucage *et al.*, 1981, *Tetrahedron Letters* 22:1859 y el método en soporte sólido descrito en la patente estadounidense núm. 4 458 066. Además, pueden añadirse modificaciones en los oligonucleótidos para afectar el comportamiento de las enzimas con respecto a los oligonucleótidos. Por ejemplo, la incorporación de enlaces fosfodiéster modificados (p.ej., fosforotioato, metilfosfonatos, fosfoamidato o boranofosfato) o enlaces distintos a los derivados del ácido fosforoso en una sonda pueden usarse para prevenir la escisión en un sitio que se seleccione; o, por ejemplo, la inclusión 20 de azúcares modificados en 2' con un grupo amino favorecerá probablemente el desplazamiento hacia la digestión del oligonucleótido.

La extensión del cebador(s) oligonucleótido dependiente de molde se cataliza mediante un agente de polimerización en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y 25 dTTP) o análogos, como se describe anteriormente, en un medio de reacción compuesto por sales, cationes metálicos y sistemas de taponamiento del pH adecuados. Los agentes de polimerización adecuados son enzimas que catalizan la síntesis del cebador y la síntesis de DNA dependiente del molde y poseen una actividad nucleasa 5' a 3'. Las DNA-polimerasas que se conocen incluyen, por ejemplo, DNA-polimerasa I de *E. coli*, DNA-polimerasa *Tth*, DNA-polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*, DNA-polimerasa de *Thermococcus littoralis*, DNA-polimerasa *Taq* y DNA-polimerasa 30 *Z05*. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de DNA con estas DNA-polimerasas se conocen bien en la materia. Para que el agente de polimerización sea útil en la presente invención, debe escindir el oligonucleótido eficientemente y liberar fragmentos marcados para que se genere la señal directa o indirectamente.

Los productos de la síntesis son moléculas de cadena doble que están formadas por cadenas molde y las cadenas 35 de extensión del cebador. Los fragmentos de sonda son los subproductos de esta síntesis, que pueden estar formados por una mezcla de mono-, di- y fragmentos de oligonucleótidos de mayor longitud. Los ciclos de desnaturalización, hibridación entre la sonda y el cebador, extensión del cebador y escisión de la sonda que se producen repetidamente dan lugar a una acumulación exponencial de la región definida por los cebadores y a la generación exponencial de 40 fragmentos marcados. Se realizan un número de ciclos suficiente para alcanzar una cantidad de fragmentos de sonda detectable, que es generalmente varios órdenes de magnitud superior que la señal de fondo.

En un método preferido, la reacción de la PCR se realiza como un proceso automático que utiliza enzimas termoestables. En este proceso la mezcla de reacción se somete a ciclado con una fase de desnaturalización, una fase 45 de hibridación de la sonda y el cebador y una fase de síntesis, en las que la escisión y el desplazamiento ocurren de manera simultánea con la extensión del cebador dependiente del molde. Puede emplearse un ciclador térmico, como la máquina comercializada por Applied Biosystems, que está diseñada específicamente para su uso con una enzima termoestable.

En este proceso automático se prefiere una polimerasa termoestable, ya que el modo preferido de desnaturalización 50 de los productos de extensión de cadena doble es mediante la exposición a una temperatura elevada (95°C aproximadamente) durante el ciclo de la PCR. Por ejemplo, la patente estadounidense núm. 4 889 818 presenta una enzima termoestable representativa procedente de *Thermus aquaticus*. Otras polimerasas termoestables representativas incluyen, p.ej., la polimerasas que se extraen de las bacterias termoestables *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (que poseen una temperatura óptima algo inferior a las que se han mencionado anteriormente), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga maritima*, *Thermococcus littoralis* y *Methanothermus fervidus*.

La sonda en la reacción de la nucleasa 5' es cualquier oligonucleótido que pueda utilizarse para identificar el genotipo del ácido nucleico diana. Normalmente, la sonda contiene una secuencia de nucleótidos que corresponde 60 a una región del ácido nucleico diana. Para poner en práctica los métodos de la presente invención, la región debe contener la posición 937 del gen de la NS5A.

La secuencia de nucleótidos de la sonda puede tener una longitud cualquiera para que genere fragmentos en la reacción de la nucleasa. En ciertos modos de realización, la secuencia de nucleótidos de la sonda es frecuentemente de 65 al menos 6 nucleótidos de longitud y menos de 140 nucleótidos. En un modo de realización, la sonda presenta entre 14 y 60 nucleótidos de longitud. En un modo de realización preferido, la sonda tiene entre 14 y 35 nucleótidos de longitud. La longitud de la sonda se escogerá de modo que aporte suficiente estabilidad termodinámica para asegurar la hibridación de la sonda a la diana, en la temperatura de la fase de hibridación en la PCR. Por ejemplo, las sondas que

ES 2 294 589 T3

presentan bases de DNA no convencionales pueden ser de mayor o menor longitud que las que tienen bases de DNA convencionales. Como en otro ejemplo, las sondas con secuencias ricas en A/T tienen mayor longitud que las que presentan secuencias ricas en G/C. El lugar de la variación del nucleótido puede estar ubicado en cualquier lugar de la secuencia de nucleótidos de la sonda. En los modos de realización preferidos, el lugar de la variación del nucleótido no está en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de la sonda.

Normalmente, la secuencia de nucleótidos de la sonda es idéntica o complementaria a la región diana. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de la sonda puede tener menos del 100% en grado de similitud o complementariedad con la región de nucleótidos diana. En ciertos modos de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos de la sonda puede presentar un grado de similitud o complementariedad con la región de nucleótidos diana de un 99%, 10 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% o 80%. En ciertos modos de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos de la sonda se hibrida con la región de nucleótidos diana en condiciones estrictas. En otros modos de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos de la sonda se hibrida con la región de nucleótidos diana en condiciones poco estrictas.

Además de la secuencia de nucleótidos de la sonda, la sonda puede contener secuencias de nucleótidos adicionales u otros grupos que no interfieren con los métodos de la invención inmediata. En unos modos de realización de la invención adecuados, la sonda puede contener secuencias de nucleótidos adicionales u otros grupos que faciliten los métodos de la invención inmediata. Por ejemplo, la sonda puede estar bloqueada en su extremo 3' terminal para evitar 15 que se propicien amplificaciones no deseadas. Pueden estar presentes también grupos en la sonda que desestabilicen la hibridación de la sonda o de los fragmentos de la sonda con la secuencia de nucleótidos diana.

En ciertos modos de realización de la invención, la sonda puede contener un marcador. En unos modos de realización adecuados, el marcador puede ser un marcador que facilite la determinación de tamaño de los fragmentos de la 20 sonda diana que se producen por las reacciones de la nucleasa.

La sonda se puede marcar mediante la incorporación de regiones detectables a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. El método para unir o conjugar el marcador a la sonda oligonucleótida dependerá, por supuesto, del tipo de marcador(es) utilizados y la posición del marcador en la sonda.

En el ámbito se conocen una gran variedad de marcadores que serían adecuados para utilizarlos en el análisis, así 30 como métodos para la inclusión de los marcadores en la sonda, estos son, pero no se limitan a enzimas (p.ej., fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante) y substratos enzimáticos, átomos radiactivos, colorantes fluorescentes, cromóforos, marcadores quimioluminescentes, marcadores electroluminescentes como el Origin™ (Igen), ligandos que 35 tienen parejas de unión específicas o otros marcadores que puedan reaccionar el uno con el otro, para aumentar, alterar o disminuir una señal. Se da por supuesto que si las reacciones de nucleasa se tienen que realizar utilizando un Thermo Cycler, el marcador tiene que soportar la temperatura de ciclado de este proceso automatizado.

Entre los átomos radiactivos se prefiere el ³²P. En el ámbito se conocen los métodos para introducir el ³²P en los 40 ácidos nucleicos y estos son, por ejemplo, el marcador 5' con cinasa o la inserción aleatoria mediante la traslación de mallas. Normalmente, los enzimas se pueden detectar por su actividad. "Pareja de unión específica" se refiere a una proteína que puede unirse a una molécula de ligando con una alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico del mismo. Otras parejas de enlace específicas son la biotina y la avidina o la estreptavidina, la IgG y la proteína A, y las numerosas parejas de ligandos-receptores conocidas en 45 la materia. Debería entenderse que la descripción anterior no pretende clasificar los diversos marcadores en distintas clases, ya que el mismo marcador puede ser utilizado de diferentes modos. Por ejemplo, el ¹²⁵I puede utilizarse como marcador radiactivo o como un reactivo electrónico denso. El HRP puede utilizarse como enzima o como antígeno para un anticuerpo monoclonal. Además, se pueden combinar diversos marcadores para obtener el efecto deseado. Por ejemplo, se puede marcar una sonda con biotina y detectar su presencia con avidina marcada con ¹²⁵I, o con 50 un anticuerpo monoclonal antibiotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán evidentes por aquellos entendidos en la materia y se consideran equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Los marcadores se pueden unir al oligonucleótido directa o indirectamente mediante una gran variedad de técnicas. Dependiendo del tipo preciso de marcador que se utilice, el marcador podrá estar situado en el extremo 5' o 3' de la 55 sonda, internamente en la secuencia de nucleótidos de la sonda o unido al brazos espaciadores de varios medidas y composiciones para facilitar las interacciones de la señal. Utilizando reactivos de fosforamidita disponibles en el Mercado, se pueden producir oligómeros que contienen grupos funcionales (p.ej., tioles o aminas primarias) en cualquier extremo, a través de una fosforamidita protegida adecuadamente y estos se pueden marcar utilizando los protocolos descritos en, por ejemplo, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. by Innis et al., Academic Press, Inc., 1990.

Los métodos para introducir reactivos que ejercen la función de un oligonucleótido para introducir una o más 60 regiones sulfhidrilo, amino o hidroxilo en la secuencia de la sonda oligonucleótida, generalmente en el extremo 5' se describen en la patente estadounidense núm. 4 914 210. Un grupo fosfato 5' se puede introducir como radioisótopo utilizando cinasa polinucleótida y [γ -³²P] ATP para obtener un grupo indicador. La biotina se puede añadir al extremo 5' mediante la reacción de un residuo de aminotimidina o un ligador alquilamino, introducidos durante la síntesis con un éster N-hidroxisuccinimida de biotina.

ES 2 294 589 T3

Los marcadores en el extremo 3' pueden utilizar transferasa terminal polinucleótida para añadir la región deseada, como por ejemplo, la cordicepina ³⁵S-dATP, y dUTP biotinilado.

Los derivados de los oligonucleótidos también son marcadores disponibles. Por ejemplo, el eteno-dA y el eteno-A

- 5 son nucleótidos de adenina fluorescentes conocidos que se pueden incorporar en una sonda oligonucleótida. De forma similar, el eteno-dC es otro análogo que puede utilizarse en la síntesis de la sonda. Las sondas que contienen dicho derivado nucleótido se pueden hidrolizar para liberar de un modo mucho más intenso mononucleótidos fluorescentes mediante la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa de los extremos, del mismo modo que la DNA polimerasa extiende un cebador durante la PCR.

10 En un modo de realización preferido para practicar la presente invención, el marcador es fluorescente para facilitar la detección de los fragmentos oligonucleótidos. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a fluoresceína, polihalofluoresceínas preferiblemente hexaclorofluoresceína, coumarinas, rodaminas, cianinas, oxazinas, tiacinas y esquarainas. En un modo de realización aun más preferente, una sola sonda se marca doblemente con un colorante 15 fluorescente (es decir, un marcador) y un inhibidor. Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia del marcador se para con un inhibidor. La escisión de la sonda entre el marcador y el inhibidor resulta en una disminución de la inhibición de la fluorescencia emitida por el marcador. Una combinación ejemplar para practicar este aspecto de la invención es el colorante fluorescente rodamina 590 y el inhibidor cristal violeta.

20 La identidad del nucleótido en la posición 937 del gen de la NS5A se puede determinar en el mismo análisis con la determinación del tipo o del subtipo del VHC en una muestra (es decir, análisis genotípico del VHC) utilizando una sola reacción nucleasa del extremo 5'. En dicho modo de realización, una sonda que se utiliza para detectar la 25 substitución de nucleótidos en la posición 937 en el gen NS5A se mezcla con una o más sondas que se utilizan para el análisis genotípico del VHC (por ejemplo sondas que hibridan en la región 5'UTR del genoma del VHC donde hay una diversidad de secuencias elevada) dentro de una sola reacción nucleasa 5'. En un modo de realización preferido, cada sonda individual constará de su único marcador (por ejemplo un único colorante fluorescente) para distinguir su señal del señal(es) generados desde otras sondas dentro de la misma reacción nucleasa 5'.

30 El nucleótido en la posición 937 se puede identificar utilizando una derivación de la reacción nucleasa denominada análisis de hibridación/fusión post PCR. Las sondas marcadas doblemente (es decir, sondas que constan de un colorante fluorescente con un inhibidor) en las reacciones nucleasa 5', se han utilizado normalmente para generar señales fluorescentes durante la PCR a tiempo real o cinético, en la forma de una curva de crecimiento, desde la cual se calcula un Ct y se utiliza para generar resultados en un algoritmo cuantitativo o cualitativo. Durante este proceso, la sonda se escinde mediante una enzima con actividad nucleasa 5', generando así una variedad de fragmentos 35 de DNA, algunos de los cuales aun permanecen marcados con el indicador fluorescente. Una vez generados estos fragmentos, ya no pueden participar en la generación de señales. Sin embargo, en algunas circunstancias, la sonda doblemente marcada intacta en toda su longitud se puede dejar atrás, después de que la PCR se haya completado. Si hay una cantidad de sonda sobrante suficiente, se puede utilizar para conseguir más información sobre el ácido 40 nucleico diana que se ha amplificado, mediante la realización de una fase de fusión durante la cual la sonda se fundirá en el ácido nucleico diana y el cambio en la fluorescencia resultante utilizado para determinar la temperatura de fusión (Tf) de la sonda en este ácido nucleico diana concreto, que se puede correlacionar con secuencias que encajen y que no encajen (es decir, análisis genotípico). El cambio en la fluorescencia se debe al cambio en la distancia entre el indicador fluorescente y el inhibidor, como las transiciones de la sonda entre una estructura aleatoria y una estructura hibridada, con las bases apareadas del ácido nucleico diana. Mediante la realización de una PCR asimétrica en el que 45 la concentración del cebador que genera la cadena a la que la sonda se une está en exceso, se reducirá la cantidad de sonda escindida durante la PCR y se asegurará que sobra suficiente sonda para realizar el análisis de fusión post PCR.

50 El nucleótido en la posición 937 se puede determinar mediante la utilización de compuestos o agentes intercalados obstruyentes o agentes, tal y como se describe en la patente estadounidense núm. 6 031 098 incorporada por la 55 presente mediante referencia en su totalidad. Brevemente, estos compuestos que pueden llevar un marcador detectable o pueden realizar fotólisis catalizadora son suficientemente obstruyentes de modo que se intercalan sólo entre bases de nucleótidos en presencia de malapareamiento de bases, y se utilizan para detectar variaciones de nucleótido único.

Otra técnica útil a la hora de detectar el nucleótido en la posición 937 es la espectrometría de masas (EM). La 60 tecnología de EM más usada generalmente en el área del genotipaje de los ácidos nucleicos ha sido el Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-MS) aunque Liquid Chromatography emparejado al Electrospray/Ionspray (LC-ESI/MS) también está adquiriendo importancia como un instrumento importante. Normalmente, la determinación de la secuencia de ácidos nucleicos mediante EM se hace a través de métodos de secuenciación de DNA convencionales como el método de terminación de cadena, utilizando un cebador junto con una mezcla definida de desoxiribonucleótidos y didesoxiribonucleótidos y la medición de la "escala" resultante mediante MALDI. En otro método descrito en la 65 patente estadounidense núm. 6 258 538, por la presente incorporada mediante referencia en su totalidad, el ácido nucleido diana se inmoviliza en un soporte sólido. Entonces, se hibrida un cebador al ácido nucleico diana en un lugar adyacente a la posición nucleótida que va a ser analizada. La extensión del cebador se lleva a cabo en presencia de una mezcla seleccionada de desoxiribonucleótidos y didesoxiribonucleótidos. La mezcla resultante de los cebadores extendidos y no extendidos se analiza mediante espectrometría de masa para determinar la identidad del nucleótido en la posición en cuestión.

ES 2 294 589 T3

Las técnicas de detección basadas en las proteínas también pueden ser útiles, especialmente a la hora de determinar la identidad del aminoácido en la posición 313 de la proteína NS5A de VHC-1a de la presente invención. Para detectar variaciones de aminoácidos, pueden usarse técnicas de secuenciación de proteínas. Por ejemplo, la proteína NS5A o fragmentos de la misma, se pueden sintetizar mediante expresión recombinante, utilizando un fragmento de polinucleótido NS5A, aislado de un individuo para ser analizado. Preferiblemente, se utiliza un fragmento del cDNA de NS5A de no más de 100 a 150 pares de bases que rodea el nucleótido de la posición 937. La secuencia de aminoácidos del péptido se puede determinar, entonces, mediante métodos de secuenciación de proteínas convencionales. La técnica de espectrometría de masa tandem HPLC microscópica, desarrollada recientemente, también se puede utilizar para determinar las variaciones de la secuencia de aminoácidos. En esta técnica, la digestión proteolítica se realiza en una proteína y la mezcla de péptidos resultante se separa mediante separación en cromatografía en fase invertida. Entonces, se realiza la espectrometría de masa tandem y los datos recogidos se analizan. Véase Gatlin *et al.*, *Anal. Chem.*, 72:757-763 (2000).

Otras técnicas de detección de gran utilidad basadas en las proteínas son los análisis de inmunoafluorimetría basados en los anticuerpos específicos de idiotipo, es decir, anticuerpos específicos a las proteínas que constan de substituciones de aminoácidos, según la presente invención. Los anticuerpos se pueden utilizar para inmunoprecipitar proteínas específicas a partir de muestras de solución o para realizar una inmunotransferencia de proteínas separadas por p.ej. geles de poliacrilamida. Los métodos inmunocitoquímicos se pueden utilizar también para detectar polimorfismos específicos de proteína en tejidos o células. También otras técnicas bien conocidas basadas en los anticuerpos se pueden utilizar, son, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés), ensayo immunoradiométrico (IRMA, por sus siglas en inglés) y ensayo inmunoenzimático (LEMA, por sus siglas en inglés), incluyendo análisis tipo sándwich que utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase p.ej., las patentes estadounidenses núms. 4 376 110 y 4 486 530, las cuales están incorporadas aquí por referencia.

La presente invención también se refiere a equipos y a recipientes que contienen componentes útiles para practicar el presente método. Un equipo de gran utilidad puede contener oligonucleótidos utilizados para detectar la substitución nucleótida en la posición 937 en la substitución génica NS5A en la posición 937. En algunos casos, las sondas de detección se pueden fijar a una membrana de soporte adecuada. El equipo también puede contener cebadores de amplificación para amplificar la región del locus NS5A que rodea el lugar de substitución, ya que estos cebadores son muy útiles en un modo de realización preferente de la invención. Alternativamente, los equipos pueden contener un conjunto de cebadores que constan de un cebador específico de secuencia para la amplificación específica del gen de la NS5A. Otros componentes opcionales de los equipos son reactivos adicionales, utilizados en los métodos de genotipaje como se describe en este documento. Por ejemplo, un equipo puede contener, adicionalmente, un agente para catalizar la síntesis de productos de extensión del cebador, substratos de trifosfatos nucleosídicos, medios para marcar y/o detectar ácidos nucleicos (por ejemplo, un conjugado de enzima de avidina y substrato de enzima y cromogen si el marcador es biotina), tampones adecuados para la amplificación o las reacciones de hibridación y instrucciones para llevar a cabo el presente método.

Los ejemplos de la presente invención presentados a continuación se proporcionan sólo con propósitos ilustrativos y no para limitar el alcance de la invención. Los numerosos modos de realización de la invención dentro del alcance de las reivindicaciones que siguen a los ejemplos serán evidentes para aquellos entendidos en la materia a partir de la lectura del texto precedente y los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Resumen del estudio clínico del Roferon

El ensayo N-139203/NV14524B de Roferon®-A (IFN-a-2A) era un estudio clínico aleatorizado, multicéntrico en fase III completado el Julio de 1997. El objetivo era comparar la eficacia y la seguridad del Roferon®-A (un tratamiento de 6 MIU a 3 MIU) durante 24 semanas y 48 semanas en el tratamiento de pacientes crónicos de VHC (ver Tabla 1).

La distribución de los genotipos de VHC entre los pacientes se presenta en la Tabla 2. Basándose en la probabilidad de respuesta investigada utilizando el procedimiento de Logistic Regression en SAS, no se encontraron diferencias en las medidas del pre-estudio (viremia, genotipos del VHC, respuesta viral, edad, sexo, género, raza, área de superficie corporal, estadio de la enfermedad, índice de actividad histológica, y ALT).

Las etapas utilizadas para la recolección de las mediciones bioquímicas (test de enzimas hepáticas o ALT) y virológicas (carga viral por PCR) para el análisis de los datos son Semana 0 (primer día de tratamiento activo del ensayo), Semana 12, Semana 20, Semana 24, Semana 48 y Semana 72. Todos los análisis, incluyendo tablas, listados y gráficos se realizaron utilizando el procedimiento SAS PROC GLM. La tasa de respuesta era del 15% en el grupo de la Semana 24 y del 19% en el grupo de la Semana 48 y eran estadísticamente equivalentes.

ES 2 294 589 T3

TABLA 1
Clasificación de los grupos

grupo	Duración por dosis de 6 MIU recibida	Duración por dosis de 3 MIU recibida	Número total de pacientes	Número total de pacientes con ausencia de eficacia de seguimiento
Grp 1	12 semanas	12 semanas	212	26
Grp 2	12 semanas	36 semanas	210	45

TABLA 2
Distribución de los genotipos

GENOTIPO	Núm. en Grp 1	Núm. en Grp 1
1a	89	93
1b	55	55
2 ^a -c	29	33
3 ^a -b	30	23
4c	2	1
6	0	1
ausente	7	4

Resumen del Análisis de la Secuencia

Se realizó un gráfico tanto para la respuesta bioquímica (ALT) como para la virológica (PCR) en varios puntos temporales y se utilizó para valorar el resultado del tratamiento (ver Tabla 3 para las reglas de clasificación de los resultados del tratamiento). Utilizando suero almacenado de los pacientes de un ensayo clínico con Roferon (NV14524), se obtuvieron, de Professional Genetics Laboratories (PGL, en Uppsala, Suecia), las secuencias de la región NS5A del subgenoma viral pre-tratamiento y durante-tratamiento de pacientes Sin respuesta (SR) o con Remisión completa (RC). Se incluyeron en el análisis 28 muestras de un total de 110 pacientes de VHC-1b (18 SR, 10 RC) y 24 muestras de un total de 182 VHC-1a (13 SR, 11 RC) se incluyeron en el análisis. Se utilizó MineSet de Silicon Graphics para construir árboles de decisión y para clasificar las personas en base al resultado del tratamiento.

TABLA 3
Categorías de resultado del tratamiento con IFN

Resultado	Normas
Sin respuesta (SR)	Los pacientes muestran presencia de RNA del VHC detectable mediante RT-PCR a lo largo del tratamiento y al final del tratamiento.
Recaída (R)	Los pacientes muestran ausencia de RNA del VHC detectable sérico mediante RT-PCR en un determinado momento durante el tratamiento, seguido por una detección posterior de RNA del VHC durante el tratamiento, seguido de una posterior detección de RNA del VHC al final del tratamiento
Recaída	Los pacientes muestran ausencia de RNA del VHC sérico me-

ES 2 294 589 T3

5	post tratamiento (RPT)	diante RT-PCR al final del tratamiento, seguido de una posterior detección de RNA del VHC 24 semanas después de finalizar el tratamiento.
10	Remisión completa (RC)	Los pacientes muestran ausencia de RNA del VHC sérico detectable mediante RT-PCR al final del tratamiento y 24 semanas después del final del tratamiento.

El cambio aminoacídico en la región NS5A se transformó a formato binario. Alternativamente, los datos de la secuencia se representaron mediante la construcción de una tabla con todos los aminoácidos posibles para cada posición de residuo de la proteína, utilizando un “0” para indicar que el residuo no está presente y un “1” para indicar que el residuo está presente, para anotar la secuencia aminoacídica real. El software identificó mutaciones que fueron asociadas bien a remisión completa o a no respuesta al tratamiento con IFN. A partir de los árboles, se construyeron las normas que describían el trayecto escogido para alcanzar las “hojas” de cada rama, por ejemplo, de las 8 secuencias de VHC-1b que tenían una valina en la posición 73 pero no tenían una alanina en la posición 195, todas fueron no respuesta. Asimismo, se establecieron otras normas para todas las “hojas” del árbol. La estrategia habitual de análisis para la construcción del árbol de decisión es dividir los datos en dos partes, una para construir el árbol y otra para comprobar el árbol. Dado el pequeño número de pacientes de los que se obtuvieron los datos de la secuencia NS5A, se utilizaron todos los datos para construir el árbol. Cuando las normas se aplicaron a los datos otra vez, el índice de no clasificación fue del 14% para VHC-1b y del 4% para VHC-1a. Los resultados detallados para VHC-1a se presentan 25 en la Tabla 4.

TABLA 4

Evaluación de la predicción de NS5A-1a

30	Muestra	Respuesta	Aminoácido	Muestra	Respuesta	Aminoácido	
		actual	en la po- sición 313		actual	en la po- sición 313	
35	97-2195	SR	I	97-2226	RC	I	
	97-2227	SR	I	97-2229	RC	V	
	40	97-2228a	SR	I	97-2232	RC	A
	97-2228b	SR	I	97-2234	RC	V	
	97-2231a	SR	I	97-2235	RC	V	
	97-2231b	SR	I	97-2237	RC	V	
	97-2236	SR	V	98-654a	RC	V	
	97-2481	SR	I	98-654b	RC	V	
	50	98-648	SR	V	98-656	RC	V
	98-650	SR	I	98-657	RC	V	
55	98-652a	SR	I	99-662	RC	V	
	98-652b	SR	I				
	98-653	SR	I				

Por lo tanto, 92 % de ✓313I = NR

60

De acuerdo con estos resultados, la asociación del residuo aminoacídico 313I (Isoleucina) con SR era estadísticamente significativa (test exacto de Fischer, $p<0,001$) en pacientes con VHC-1a que tenían una probabilidad 5,5 veces superior de no presentar respuesta (resistencia al tratamiento con interferón). La observación del patrón de la secuencia (residuos 73V & 195A) en pacientes con VHC-1b no fue estadísticamente significativa (test de ji-cuadrado, χ^2 con 2 grados de libertad=1,49).

ES 2 294 589 T3

Amplificación secuencia-específica/Extensión del Cebador

La amplificación preferente de una variación nucleotídica respecto a otra se puede conseguir mediante el cambio de la base en el extremo 3' de uno de los cebadores. Para amplificar preferentemente la variante "A", la mejor opción es 5 diseñar un cebador en dirección 5' en la cadena sentido, terminando con una A en lugar de una G, para favorecer el malapareamiento A-C que es más desestabilizante que el malapareamiento G-T.

La longitud del cebador se determina mediante la intención de conseguir una Tf total de aproximadamente 65°C para cada cebador, utilizando la *Oligonucleótido Properties Calculator* de la Northwestern University, <http://www.basic.northwestern.edu/fbltools/oligocalc.html>. La medición de Sales Ajustadas se utiliza en todos los casos. Un ejemplo 10 de cebador en dirección 5' es el siguiente:

Cadena sentido: 5'- GATTGCCCCAGCCCTGCCA*-3' (NÚM. ID. SEC.:3) (el asterisco indica el nucleótido 15 de la posición 937)

El cebador apareado en dirección 3' se puede diseñar utilizando el Oligo Primer Analysis Software, versión 6.32 (Molecular Biology Insights, Inc.). Un ejemplo de tal cebador se muestra a continuación:

20 Cadena anti-sentido: 5'- GGCCAAGGCAGTAGGTAGGGT-3' (NÚM. ID. SEC.:4)

Para amplificar preferentemente la variante "G", una opción es diseñar un cebador dirección 3' en la cadena anti-sentido del DNA diana, que termina con una C en lugar de una T para obtener el malapareamiento C-A más desestabilizante. Para una desestabilización adicional de la base terminal malpareada, se pueden usar t-butil-bencil-dA o t-butil-bencil-dC, respectivamente, para la última base, añadiendo un grupo voluminoso que puede añadir obstrucción 25 esteárica en la extensión del molde perfectamente apareado por encima del molde malpareado. Un ejemplo de cebador en dirección 3' es el siguiente:

30 Cadena anti-sentido: 5'- GTAGTCGGCCGCCGCGCCCAGAC*-3' (NÚM. ID. SEC.:5) (el asterisco indica el nucleótido de la posición 937)

Un ejemplo del cebador apareado en dirección 5', también utilizando Oligo 6.32, se muestra a continuación:

35 Cadena sentido: 5'- CATAGTTGCGCCCCCTTGC-3' (NÚM. ID. SEC.:6)

Las condiciones de amplificación deberían ser el máximo de rigurosas posible para facilitar la amplificación de 40 una variante y sobre la otra. Esto se puede conseguir mediante la selección meticulosa de las condiciones de cada ciclo termal, especialmente la temperatura de hibridación/extensión para asegurarse que favorece la apareamiento 3' perfecto apareado sobre el malapareamiento del par de bases 3'. El Tf del cebador se diseña alrededor de 65°C, de modo que se comprueban las temperaturas de hibridación de 58-65°C para determinar la mejor temperatura para favorecer la variante nucleotídica de interés.

45 Las condiciones de ciclo termal típicas, tal y como se usan en un instrumento del tipo COBAS TaqMan 96, serían: 95°C durante 20 segundos, seguido por la hibridación/extensión a 58-65°C durante 40 segundos, en un total de 35 ciclos de amplificación. Después de la amplificación, los productos de la PCR se pueden visualizar mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2,5%. Además, el colorante intercalador, Sybr Green se puede añadir a una concentración de 0,2x durante la amplificación para una detección en PCR en tiempo real utilizando un ciclador termal capaz de leer el aumento de señal del colorante, tal como el ABI PRISM 7700.

50 La mezcla principal para una PCR típica consiste en los siguientes elementos, mostrados en concentración final por 100 µl de reacción:

Polimerasa ZO5	20 unidades
Tricina, pH8,0	100 mM
KOAc, pH7,5	25 mM
Glicerol	9,0%
dATP	200 µM
dUTP	200 µM
dGTP	200 µM
dCTP	200 µM

ES 2 294 589 T3

Cebador 1	25 pmol
Cebador 2	25 pmol

5 Reacción nucleasa 5'

Un malpareamiento de un solo par de bases puede diferenciarse utilizando una sonda química de nucleasa 5' y una optimización cuidadosa de la temperatura de hibridación/extensión para favorecer la escisión del molde perfectamente apareado sobre el molde malapareado. Las sondas de nucleasa 5' que contienen un colorante indicador (por ejemplo, FAM) y un colorante inhibidor de la fluorescencia (por ejemplo, CY5), se diseñan habitualmente con una Tf de aproximadamente 10 grados por encima de las Tfs de los cebadores, para facilitar que la sonda se hibride a la secuencia diana antes de la extensión de los cebadores y la posterior escisión de la sonda. Esta escisión separa el colorante indicador del colorante inhibidor, permitiendo que se puedan medir las emisiones del colorante indicador. En rondas repetidas de PCR, estas emisiones del colorante aumentan con el aumento de amplicones generados y se pueden representar en una gráfica como curvas de crecimiento, mostrando un aumento en la fluorescencia a medida que aumenta el número de ciclos. Un malapareamiento entre la secuencia sonda y la molde puede desestabilizar la unión y la posterior escisión de la sonda.

Un ejemplo de una sonda nucleasa 5' para diferenciar entre las variantes "G" y "A" se muestra a continuación:

20 Cadena anti-sentido: 5'-FAM-CAGA(C/T)GGGCAGGGCTGGGGCGA-CY5-3' (NÚM. ID. SEC.:7)

La sonda nucleasa 5' se añade a la mezcla de reacción de PCR como se describe en el ejemplo previo, a una concentración final de 10 pmol. Esta sonda está diseñada para tener una Tf de aproximadamente 72°C para que se unan 25 antes los cebadores que están diseñados para tener una Tf de aproximadamente 65°C. Los cebadores compatibles para esta región de sonda también se diseñan utilizando el programa Oligo 6,32 y los ejemplos se muestran a continuación:

30 Cebador de la cadena sentido: 5'- GAGATGGCACCATCACC-3' (NÚM. ID. SEC.:8)

Cebador de la cadena anti-sentido: 5'- GGCAAAGTAGGTAGGGT-3' (NÚM. ID. SEC.:9)

Se pueden utilizar condiciones de ciclo termal similares, tal y como se menciona en el ejemplo previo.

35 Se puede utilizar un ciclador termal capaz de excitar el colorante indicador y medir su posterior emisión fluorescente, tal como el COBAS TaqMan 96 o el ABI PRISM 7700.

Análisis de fusión post-PCR

40 Otro método para distinguir las variaciones de un único par de bases es diseñar cebadores que amplifiquen el área alrededor del sitio de variación, después de la reacción de PCR, que generen una de curva de fusión utilizando 45 sondas marcadas con fluorescencia diseñadas para hibridarse con la región de interés. Normalmente, una curva de fusión se genera mediante la desnaturización de los productos amplificados en la PCR después del ciclo final de amplificación en la presencia de sondas marcadas con fluorescencia, mediante calentamiento a 95°C. La temperatura es entonces rápidamente enfriada a 40°C para favorecer la rehibridación rápida de las sondas a las regiones homólogas 50 del amplicón. Entonces la temperatura es lentamente aumentada a 80°C, con lecturas de fluorescencia frecuentes en cada fase de temperatura. Cuando la temperatura alcanza el punto donde las sondas se disocian del amplicón, se produce un cambio en la fluorescencia de las sondas marcadas y este cambio en la fluorescencia se puede medir. Un malapareamiento de un único par de bases entre la sonda y el amplicón, causará la disociación o "fusión" de la sonda a una temperatura más temprana que en el caso de que fuera un apareamiento perfecto, permitiendo diferenciar las dos especies por sus respectivas temperaturas de fusión. El cebador de la PCR y la sonda de la prueba en el ejemplo de la nucleasa 5' se pueden utilizar para generar las curvas de fusión.

Además, se puede utilizar otro tipo de prueba de PCR utilizando una sonda de hibridación química para generar 55 curvas de fusión diferenciales, sin embargo en este caso, utilizando dos sondas en lugar de una. La primera sonda, conocida como sonda de "anclaje", se diseña para tener una Tf a una temperatura superior a la segunda, la sonda "sensora". La sonda de anclaje se sintetiza con un colorante donante en el extremo 3', como el FAM. La sonda sensora es marcada en el extremo 5' con un colorante receptor, como el LC640. Durante la hibridación de la PCR, las dos 60 sondas son diseñadas para unirse a la región de interés con un espaciado de 1 a 5 nucleótidos entre el extremo 3' de la sonda donante y el extremo 5' de la sonda receptora. Durante este paso se transfiere la energía fluorescente desde el colorante FAM al receptor LC640 y se mide la emisión del colorante LC640. Para el siguiente paso de la PCR, se aumenta la temperatura para favorecer la extensión del producto de la PCR y la disociación del par de oligo-sondas, preservando así las sondas para los siguientes ciclos de PCR y la posterior generación de curvas de fusión. En este caso se puede utilizar un perfil de temperatura de PCR de tres pasos:

65 Paso de desnaturización a 95°C durante 20 seg

Paso de hibridación a 58°C durante 20 seg

ES 2 294 589 T3

Paso de extensión a 72°C durante 40 seg durante un total de 45 ciclos.

Esta PCR se debe hacer en un instrumento capaz de excitar el colorante FAM y de medir la emisión del colorante LC640, tal como el LightCycler 2.0.

5 Un ejemplo profético de dos sondas de hibridación que se pueden utilizar como sonda de anclaje y sonda sensora para diferenciar las dos variantes de NS5A, también utilizando los cebadores descritos en el ejemplo de la nucleasa 5', es el siguiente:

10 Sonda de anclaje: 5'-AGTCTCGGAGATTGCC-3' (NÚM. ID. SEC.:10)

Sonda sensora: 5'-LC640-GCCCTGCC(A/G)TCTG-3' (NÚM. ID. SEC.:11)

15 La sonda de anclaje ha sido diseñada para tener una Tf de 62°C, y la sonda sensora ha sido diseñada para tener una Tf de 53°C para un apareamiento perfecto de la sonda sensora al amplicón. Un malapareamiento de un único par de bases es más probable que proporcione una Tf al menos 4°C inferior a la de un apareamiento perfecto. La sonda de anclaje en este caso es espaciada con un único par de bases entre esta y la sonda sensora.

20 *Secuenciación de PCR*

Los cebadores descritos en el ejemplo de la reacción nucleasa 5' (NÚM. ID. SEC.:8 y NÚM. ID. SEC.:9) se pueden utilizar para la secuenciación de PCR utilizando las condiciones de PCR descritas previamente.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la respuesta de un sujeto humano infectado con VHC-1a a un tratamiento con interferón que comprenda:
 - a) proporcionar un polinucleótido de VHC-1a de dicho sujeto humano que comprenda una porción que incluya la posición nucleotídica 937 del gen NS5A; y
 - b) determinar si dicho nucleótido en posición 937 es G o no, donde la presencia de una G en posición 937 indica una mayor probabilidad de respuesta virológica sostenida al tratamiento con interferón por dicho sujeto humano.
2. Uso de interferón para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano infectado con VHC, donde en dicho sujeto humano infectado con VHC la posición nucleotídica 937 del gen NS5A de un polinucleótido VHC-1a es una G.
3. El método de la reivindicación 1 donde la determinación del nucleótido de la posición 937 del gen NS5A comprende la determinación del tipo o subtipo de cepa del VHC que infecta al sujeto humano.
4. El método de las reivindicaciones 1 o 3 donde dicho paso decisivo comprenda la realización de una prueba capaz de detectar una única sustitución nucleotídica en la posición 937 del gen NS5A.
5. El método de las reivindicaciones 1, 3 o 4 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda la secuenciación de una parte del gen NS5A que incluya la posición nucleotídica 937.
6. El método de las reivindicaciones 1, 3 o 4 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda una amplificación de secuencia específica o un ensayo de extensión del cebador.
7. El método de las reivindicaciones 1, 3 o 4 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda un ensayo de reacción con una nucleasa 5'.
8. El método de las reivindicaciones 1, 3 o 4 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda un ensayo de análisis de fusión post-PCR.
9. Un método para predecir la respuesta de un sujeto humano infectado con VHC-1a a un tratamiento con interferón que comprenda:
 - a) proporcionar un polipéptido VHC-1a de dicho sujeto humano que comprenda una porción que incluya la posición aminoacídica 313 de la proteína NS5A, y
 - b) determinar si dicho aminoácido en posición 313 es Valina o no, donde la presencia de Valina en posición 313 indica una mayor probabilidad de respuesta virológica sostenida a tratamiento con interferón por dicho sujeto humano.
10. Uso de interferón para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano infectado con el VHC, donde en dicho sujeto humano infectado con el VHC la posición aminoacídica 313 de la proteína NS5A de una proteína VHC-1a es Valina.
11. El uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 10 donde el tratamiento con interferón se selecciona a partir de un grupo consistente en Roferon®-A, Pegasys®, Intron® A, y Peg-Intron®.
12. Un método para predecir la respuesta de un sujeto humano infectado con VHC-1a a tratamiento con interferón que comprenda:
 - a) proporcionar un polinucleótido VHC-1a de dicho sujeto humano que comprenda una porción que incluya la posición nucleotídica 937 del gen NS5A, y
 - b) determinar si dicha posición nucleotídica 937 es una A o no, donde la presencia de una A en la posición 937 indica una mayor probabilidad de no-respuesta virológica a tratamiento con interferón por dicho sujeto humano.
13. El método de la reivindicación 12 donde la determinación del nucleótido de la posición 937 del gen NS5A comprenda la determinación del tipo o subtipo de cepa de VHC que infecta al sujeto humano.
14. El método de la reivindicación 12 donde dicho paso decisivo que comprenda la realización de una prueba capaz de detectar una única sustitución nucleotídica en la posición 937 del gen NS5A.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 14 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda la secuenciación de una porción del gen NS5A que incluya la posición 937.

ES 2 294 589 T3

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 14 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda una amplificación de secuencia específica o un ensayo de extensión del cebador.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 14 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda un ensayo de reacción de nucleasa 5'.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 14 donde dicha prueba o paso decisivo comprenda un ensayo de fusión post-PCR.
19. Un método para predecir la respuesta de un sujeto humano infectado con VHC-1a a tratamiento con interferón que comprenda:
- a) proporcionar un polinucleótido VHC-1a de dicho sujeto humano que comprenda una porción que incluya la posición aminoacídica 313 de la proteína NS5A, y
- b) determinar si dicho aminoácido en posición 313 es Isoleucina o no, donde la presencia de Isoleucina en posición 313 indica una mayor probabilidad de no-respuesta virológica sostenida a tratamiento con interferón por dicho sujeto humano.
20. Uso de un oligonucleótido de longitud entre 14 y 35 nucleótidos y siendo esencialmente complementario a cualquiera de las cadenas en una región del gen NS5A que incluya la posición nucleotídica 937 para predecir la respuesta de un sujeto humano infectado con VHC-1a al tratamiento con interferón.
21. El uso de la reivindicación 20, donde dicha región se extienda desde la posición nucleotídica 908 a la posición nucleotídica 957 de ID SEC NÚM.:1.
22. El uso de la reivindicación 20 seleccionada a partir del grupo que consiste en ID SEC NÚM:3, ID SEC NÚM:5, ID SEC NÚM:7, ID SEC NÚM:10, y ID SEC NÚM:11.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 294 589 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> NS5A Variación de la secuencia de nucleótidos como marcador para la Respuesta del interferón

<130> caso 22600

10 <160> 11

<170> PatentIn version 3.2

15 <210> 1

<211> 1338

<212> DNA

20 <213> Virus Hepatitis C

<400> 1

25 **tccctggctaa gggacatctg ggactggata tgcgaggtgc tgaggcactt taagacacctgg** 60

ctgaaaagcca agctcatgcc acaactgcct gggattccct ttgtgtccctg ccagcgcggg 120

30 **tatagggggg tctggcgagg agacggcatt atgcacactc gctgccactg tggagctgag** 180

atcactggac atgtcaaaaaa cgggacgatg aggatcgctg gtccttaggac ctgcaagaac 240

35 **atgtggagtg ggacgcttctt cattaatgcc tacaccacgg gccctgtac tccccttctt** 300

gcgcgcgaact ataagttcgc gctgtggagg gtgtctgcag aggaatacgt ggagataagg 360

40 **cgggtggggg acttccacta cgtatcgggc atgactactg acaatctcaa atgcccgtgc** 420

cagatcccat cgcccgaatt tttcacagaa ttggacgggg tgccctaca taggtttgcg 480

45 **cccccttgca agcccttgct gcgggaggag gtatcattca gagtaggact ccacgagttac** 540

50

55

60

65

ES 2 294 589 T3

	ccgggtgggt cgcaattacc ttgcgagccc gaaccggacg tagccgtgtt gacgtccatg	600
5	ctcaactgate cctcccatat aacagcagag gcggccggga gaagggttggc gagagggtca	660
	cccccttcta tggccagctc ctggcttagc cagctgtccg ctccatctct caaggcaact	720
10	tgcaccgcca accatgactc ccctgacgcc gagctcatag aggctaacct cctgtggagg	780
	caggagatgg gcggcaacat caccagggtt gagtcagaga acaaaagtggt gattctggac	840
15	tccttcgatc cgcttgtggc agaggaggat gagcgggagg tctccgtacc cgcaaaaaatt	900
	ctgcggaaat ctggagatt cgccccagcc ctgcccgtct gggcgccggcc ggactacaac	960
20	ccccctgctag tagagacgtg gaaaaagcct gactacgaac cacctgtgggt ccattggctgc	1020
	ccgctaccac ctccacggtc ccctcctgtg cctccgcctc ggaaaaagcg tacggtggtc	1080
25	ctcaccgaat caaccctacc tactgccttg gccgagcttg ccaccaaaag ttttggcagc	1140
	tcctcaacct ccggcattac gggcgacaat acgacaacat cctctgagcc egccccctct	1200
30	ggctgcccccc ccgactccga cgttgagtcc tattttcca tgccccccct ggagggggag	1260
	cctggggatc cgatctcg cgacgggtca tggtcgacgg tcagtagtgg ggccgacacg	1320
35	gaagatgtcg tgcgtgc	1338
	<210> 2	
40	<211> 446	
	<212> PRT	
	<213> Virus Hepatitis G	
45	<400> 2	

Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile Cys Glu Val Leu Ser Asp

50

55

60

65

ES 2 294 589 T3

1 5 10 15

5

Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met Pro Gln Leu Pro Gly Ile

10

20 25 30

15

Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Arg Gly Val Trp Arg Gly Asp

35 40 45

20

Gly Ile Met His Thr Arg Cys His Cys Gly Ala Glu Ile Thr Gly His

25

50 55 60

30

Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly Pro Arg Thr Cys Lys Asn

65 70 75 80

35

Met Trp Ser Gly Thr Phe Phe Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys

40

85 90 95

45

Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Lys Phe Ala Leu Trp Arg Val Ser

100 105 110

50

Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg Arg Val Gly Asp Phe His Tyr Val

55

115 120 125

60

Ser Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys Pro Cys Gln Ile Pro Ser

65

ES 2 294 589 T3

130 135 140
5
Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His Arg Phe Ala
10 145 150 155 160

15
16 Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Ser Phe Arg Val Gly
20 165 170 175
Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro
25
26 180 185 190
Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr
30
35 195 200 205
Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Met
40
45 210 215 220
Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr
50
55 225 230 235 240
Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala Glu Leu Ile Glu Ala Asn
60
65 245 250 255
Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser

ES 2 294 589 T3

260

265

270

5

Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Val Ala Glu

10

275

280

285

15

Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser

290

295

300

20

Arg Arg Phe Ala Pro Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn

25

305 310 315 320

30

Pro Leu Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val

325

330

335

35

Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Pro Arg Ser Pro Pro Val Pro Pro

40

340

345

350

45

Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Leu Pro Thr

355

360

365

50

Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Ser Phe Gly Ser Ser Ser Thr Ser

55

370

375

380

60

Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Ser Ser Glu Pro Ala Pro Ser

65

ES 2 294 589 T3

385

390

395

400

5

Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met Pro Pro

10

405

410

415

15

Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp Ser

20

420

425

430

25

Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Thr Glu Asp Val Val Cys Cys

435

440

445

<210> 3

30 <211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 3

40

gattcgcccc agccctgccc a

21

<210> 4

45 <211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 4

55

ggccaaggca gtaggtaggg t

21

<210> 5

60 <211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

ES 2 294 589 T3

<400> 5

gtagtccggc cgcccgcccc agac

24

5 <210> 6

<211> 21

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

15

<400> 6

cataggttgg cgccccccttg c

21

20 <210> 7

<211> 22

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda

30

<220>

<221> n.c._función

<222> (5)

35 <223> donde y es c o t/u

<400> 7

40 cagayggca gggctggggc ga

22

<210> 8

<211> 18

45 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción da Secuencia Artificial: Cebador

<400> 8

55

gagatggca ccatcacc

18

<210> 9

<211> 18

60 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

ES 2 294 589 T3

<400> 8

ggccaaagta gtagggt

18

5

<210> 10

212 DNA

10. <213> Secuencia Artificial

220

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda

15

<400> 10

agtctcgag attcgcccc

19

20

<210> 11

<211> 14

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda

30

<220>

<221> n.c._función

35 <222> (10)

gccctgccc r tctg

14

45

50

55