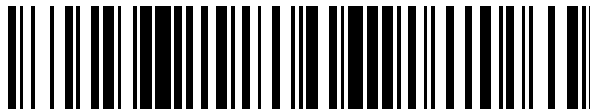


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 468**

21 Número de solicitud: 201231089

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

11.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.01.2014

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN BIOMÉDICA DEL COMPLEJO
HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE VIGO
(33.3%)**

**Av. Camelias, 109-Hospital Nicolás Peña
36211 Vigo (Pontevedra) ES;
SERVIZO GALEGO DE SAUDE (33.3%) y
UNIVERSIDAD DE VIGO (33.3%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ DA SILVA, Alfredo ;
OCAMPO HERMIDA, Antonio ;
CONSTENLA CARAMES, Lucia ;
VALVERDE PÉREZ, Diana ;
DE UÑA ALVAREZ, Jacobo y
RODRÍGUEZ GIRONDO, Mar**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODOS PARA LA PREDICCIÓN DE LA PROGRESIÓN A ENFERMEDAD DE UN SUJETO
INFECTADO CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)**

57 Resumen:

Métodos para la predicción de la progresión a enfermedad de un sujeto infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La invención proporciona un método in vitro para predecir si un sujeto infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VHI) es lentoprogresor que comprende (i) determinar el perfil genético de al menos una variante génica humana asociada a la evolución de la infección por VIH presente en un gen en una muestra de dicho sujeto y obtener el perfil genético correspondiente, donde dichas variantes son HLA B*27, HLA B*5701, HLA (rs9264942) y CCR5{de}32, y (ii) determinar la probabilidad de lentoprogresión para el perfil genético de la etapa (i) en función de un tiempo libre de enfermedad. También proporciona un método para seleccionar un sujeto infectado por VHI para una terapia personalizada.

ES 2 438 468 A2

DESCRIPCIÓN

MÉTODOS PARA LA PREDICCIÓN DE LA PROGRESIÓN A ENFERMEDAD DE UN SUJETO INFECTADO CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

5

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con un método para predecir la progresión de un sujeto infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como con un método para seleccionar un sujeto infectado por VIH para una terapia personalizada.

10

ANTECEDENTES

La evolución de los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es muy variable y depende tanto de factores propios del virus, como del ambiente y la carga genética del propio individuo. En la literatura científica se describen diversos marcadores asociados con la progresión o no de la enfermedad al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

15

A lo largo de estos años, se han estudiado varios factores genéticos del hospedador que podrían influenciar la respuesta al VIH. Entre los factores genéticos que han sido fuertemente relacionados con la progresión en varias cohortes de pacientes, se encuentran los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I. Entre los alelos que se han relacionado con la no-progresión o protección están HLA B27 y HLA B57. Se conoce que los portadores del antígeno HLA B27 presentan una menor incidencia de ciertas infecciones virales (virus Epstein-Barr, citomegalovirus, herpes simple tipo 2 y el virus influenza), así como un efecto protector de la propia evolución natural de la infección por VIH. Además, se ha descrito que ciertos condicionantes genéticos son protectores de la infección, como HLA B*5701 (Kristiansen *et al.*, 2001, J Immunol methods 252:147-51), CCR2 64I, CCR5 Δ32 (Magierowska *et al.*, 1999 Blood 93:936-41), SDF1 3'A y HLA C; por el contrario, se ha relacionado la presencia de HLA B*35, HLA Cw04 (Carrington *et al.*, 2003 Annu Rec Med 54:535-51) y Cx3CR1 con una progresión rápida (Cressey *et al.*, 2007, Infection, genetics and evolution 7:333-42; Fellay *et al.*, 2009, PLoS Genet 5:e1000791).

20

25

30

Varios grupos han estudiado la relación de asociaciones de estos factores genéticos con la carga viral sérica y/o las tasas de progresión de la enfermedad. En Fellay *et al.* (2009, PLoS Genetics 5:e1000791), los autores analizan el genoma completo de un grupo de más de 2.500 sujetos infectados por VIH con el objeto de evaluar la contribución de ciertas variantes genéticas sobre la carga viral sérica y las tasas de progresión de la enfermedad. Las variantes con mayor asociación con la progresión de la enfermedad fueron HCP5/B*5701 rs2395029 y HLA-C rs9264942, así como la variante CCR5 Δ32.

35

En WO 2008/118469, se describen métodos para determinar el riesgo de un paciente de VIH asintomático a progresar hacia SIDA mediante la determinación de la presencia de alelos menores de determinados SNPs. Estos polimorfismos incluyen los SNPs rs9264942, rs2395029, este último asociado significativamente con HLA-B*5701, y B27.

40

En Casado *et al.* (2010, PLoS ONE 5:e11079), los autores han re-evaluado las definiciones clínicas de los patrones de progresión de la enfermedad por VIH de acuerdo a un número de marcadores genéticos del sujeto infectado por VIH y de factores virales. Como resultado del análisis de los marcadores genéticos, los autores han confirmado que los alelos protectores HLA-B+ (B*2705, *5701, *5101 y *1302) y de CCR5 (CCR5_H+/H+) están asociados significativamente con una progresión lenta, y que las variantes génicas HLA-C-35 (rs9264942) y CCR5 Δ32 tienen una tendencia hacia la asociación. Los autores también observaron que los individuos lentoprogresores mantenían genotipos ancestrales de virus y baja carga viral.

45

50

En Hendel *et al.* (1999, J Immunol 162:6942-46), los autores han identificado alelos de HLA asociados con progresión rápida o lenta hacia SIDA. Sus resultados demuestran un efecto protector de alelos HLA comparable con el ejercido por CCR5 Δ32, e independiente del mismo. Se trata de los alelos B14 y C16, así como de B27, B57 y C14, pero éstos con un efecto menos significativo.

55

En Poropatich & Sullivan (2011, J Gen Virol 92:247-68), los autores realizan una revisión de los determinantes virales, genéticos e inmunológicos de sujetos infectados por VIH-1 clasificados como no-progresores de larga duración. Entre ellos se encuentran los polimorfismos CCR5 Δ32, y los alelos HLA-B5701 y B5703, y HLA-B27. Sin embargo, el alelo HLA-B27 no está significativamente asociado cuando se trata de grupos de pacientes grandes.

60

A pesar de que se conoce la influencia de determinados marcadores en la evolución de los pacientes infectados por VIH, no existe un algoritmo de análisis que permita darle un peso específico a cada marcador genético en la determinación de la progresión de la enfermedad. Además, dado que para clasificar a un sujeto como lentoprogresor debe disponerse de 8 o más años de seguimiento, tampoco existe ningún mecanismo para evaluar la condición de un paciente respecto a la lentoprogresión en sujetos con tiempo de seguimiento insuficiente.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir si un sujeto infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es lentoprogresor que comprende:

- i) determinar el perfil genético de al menos una variante génica humana asociada a la evolución de la infección por VIH presente en un gen en una muestra de dicho sujeto y obtener el perfil genético correspondiente; y
- ii) determinar la probabilidad $P(LP / Z, T > t)$ mediante la ecuación [1]:

$$P(LP / Z, T > t) = \frac{P(LP / Z)}{P(T > t / Z)} \quad [1]$$

donde

- 25 $P(LP / Z, T > t)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i) en función de un tiempo libre de enfermedad T mayor que cierto tiempo t ;
- $P(LP / Z)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i); y
- 30 $P(T > t / Z)$ representa la probabilidad de que el tiempo libre de enfermedad (T) sea mayor que cierto tiempo t para el perfil genético determinado en la etapa (i),

en donde si dicha probabilidad $P(LP / Z, T > t)$ es mayor que 0,5 entonces el sujeto es clasificado como lentoprogresor.

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con un método para seleccionar un sujeto infectado por VIH para una terapia personalizada, que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor de acuerdo al método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento si es clasificado como no lentoprogresor.

En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con un método para seleccionar una terapia personalizada para un sujeto infectado por VIH en necesidad de tratamiento, que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor de acuerdo al método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se selecciona una terapia personalizada para dicho sujeto si este es clasificado como no lentoprogresor.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende los reactivos necesarios para genotipar múltiples variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH, en donde dichas variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH se seleccionan del grupo formado por HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942), CCR5 Δ32, y combinaciones de las mismas.

En un quinto aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un kit según el cuarto aspecto de la invención, para predecir si un sujeto infectado por VIH es lentoprogresor.

En un sexto aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un kit según el cuarto aspecto de la invención, para seleccionar un sujeto infectado por VIH para una terapia individual que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor, en el que la clasificación de dicho sujeto como lentoprogresor selecciona a dicho sujeto para dicha terapia individual.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para determinar la probabilidad de que un sujeto infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) sea lentoprogresor. Dicho método

se basa en la combinación de perfiles genéticos particulares asociados a la evolución de la infección por VIH con el tiempo libre de enfermedad. Dichos perfiles genéticos se determinan a partir de los resultados obtenidos del genotipado de determinadas variantes génicas asociadas a la evolución de la infección por VIH y cuyo principal objetivo es su uso en la evaluación respecto a la lentoprogresión de la condición de un paciente con un tiempo de seguimiento insuficiente.

1. Primer método de la invención

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir si un sujeto infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es lentoprogresor, en adelante "primer método de la invención", que comprende:

- i) determinar el perfil genético de al menos una variante génica humana asociada a la evolución de la infección por VIH presente en un gen en una muestra de dicho sujeto y obtener el perfil genético correspondiente; y
- ii) determinar la probabilidad $P(LP / Z, T > t)$ mediante la ecuación [1]:

$$P(LP / Z, T > t) = \frac{P(LP / Z)}{P(T > t / Z)} \quad [1]$$

donde

- 25 $P(LP / Z, T > t)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i) en función de un tiempo libre de enfermedad T mayor que cierto tiempo t;
- $P(LP / Z)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i); y
- 30 $P(T > t / Z)$ representa la probabilidad de que el tiempo libre de enfermedad (T) sea mayor que cierto tiempo t para el perfil genético determinado en la etapa (i),

en donde si dicha probabilidad $P(LP / Z, T > t)$ es mayor que 0,5 entonces el sujeto es clasificado como lentoprogresor.

35 El término "sujeto", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a seres humanos, de sexo femenino o masculino, y de cualquier raza o edad. A lo largo de la presente descripción, se emplean los términos "sujeto" y "paciente" indistintamente.

40 El término "virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un lentivirus (un miembro de la familia de los retrovirus) causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), e incluye los dos tipos de VIH descritos hasta la fecha, llamados VIH de tipo 1 (VIH-1) y VIH de tipo 2 (VIH-2). El virión es esférico, está dotado de una envoltura y con una cápside proteica. Su genoma está compuesto por una cadena de ARN monocatenario que debe copiarse provisionalmente al ADN para poder multiplicarse e integrarse en el genoma de la célula que infecta. El proceso de conversión de ARN en ADN es una característica principal de los retrovirus y se lleva a cabo mediante la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. Los antígenos proteicos de la envoltura exterior se acoplan de forma específica con proteínas de la membrana de las células infectables, especialmente de los linfocitos T CD4+.

50 Cabe destacar la diferencia entre estar infectado por el VIH y padecer SIDA. Una persona infectada por el VIH es seropositiva y pasa a desarrollar un cuadro de SIDA cuando su nivel de linfocitos T CD4+, células que ataca el virus, desciende por debajo de 200 células por mililitro de sangre. El VIH ataca específicamente a los linfocitos T CD4+ y entra en ellos. Una vez dentro, el virus transforma su material genético de cadena simple (ARN) a uno de cadena doble (ADN) para incorporarlo al material genético propio del huésped (sujeto infectado) y lo utiliza para replicarse o hacer copias de sí mismo. Las nuevas copias del virus salen de las células, a las cuales lisan, a la sangre para infectar a otros linfocitos T CD4+. Este ciclo se repite una y otra vez.

60 El término "enfermedad" tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la condición de un sujeto de estar infectado por VIH. La enfermedad conlleva la progresión a SIDA en la mayor parte de los casos. Se dice que un sujeto padece SIDA cuando su organismo, debido a la inmunodeficiencia provocada por el VIH, no es capaz de ofrecer una respuesta inmune adecuada contra las infecciones. Los síntomas del SIDA son el resultado de las condiciones que normalmente no se desarrollan en personas

con sistemas inmunológicos saludables. La mayoría de estas enfermedades son las infecciones oportunistas causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos que se controlan normalmente con los elementos del sistema inmune que daña el VIH. Estas infecciones afectan a casi todos los sistemas orgánicos.

5

Las personas con SIDA también tienen un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer como el sarcoma de Kaposi, cáncer de cuello uterino y los cánceres del sistema inmunológico conocidos como linfomas. Además, las personas con SIDA a menudo tienen síntomas de infección sistémica, como fiebre, sudores (particularmente en la noche), glándulas inflamadas, escalofríos, debilidad y pérdida de peso. El tipo de infecciones oportunistas específicas que desarrollen los pacientes con SIDA dependerá en parte de la prevalencia de estas infecciones en el área geográfica en la que vive el paciente.

10

La infección por VIH se clasifica en diferentes categorías, de acuerdo con los síntomas y afecciones que tenga el paciente:

15

- Categoría A: pacientes con infección primaria o asintomáticos.
- Categoría B: pacientes que presentan o hayan presentado síntomas que no pertenecen a la categoría C, pero que están relacionados con la infección de VIH. Estos incluyen angiomas bacilar, candidiasis vulvo-vaginal, o candidiasis oral resistente al tratamiento, displasia de cérvix uterino o carcinoma de cérvix no invasivo, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), fiebre menor a 38,5 °C o diarrea, de más de un mes de duración, *herpes zóster* (más de un episodio, o un episodio con afección de más de un dermatoma), leucoplasia oral vellosa, neuropatía periférica, así como púrpura trombocitopénica idiopática.
- Categoría C: pacientes que presentan o hayan presentado algunas complicaciones incluidas en la definición de SIDA de 1987 de la OMS:

20

25

a) Infecciones oportunistas:

30

- Infecciones bacterianas: septicemia por *Salmonella* recurrente (diferente a *Salmonella typhi*), tuberculosis, infección por el complejo *Mycobacterium avium* (MAI), o infecciones por micobacterias atípicas.
- Infecciones víricas: infección por citomegalovirus (retinitis o diseminada), infección por el virus del herpes simple (VHS tipos 1 y 2), puede ser crónica o en forma de bronquitis, neumonitis o esofagitis.
- Infecciones fúngicas: aspergilosis, candidiasis, tanto diseminada como del esófago, tráquea o pulmones, coccidiodomicosis, extrapulmonar o diseminada, criptococcosis extrapulmonar, o histoplasmosis, ya sea diseminada o extrapulmonar.
- Infecciones por protozoos: neumonía por *Pneumocystis jiroveci*, toxoplasmosis neurológica, criptosporidiosis intestinal crónica, o isosporiasis intestinal crónica.

35

40

b) Procesos cronificados: bronquitis y neumonía.

45

c) Procesos asociados directamente con el VIH: demencia relacionada con el VIH (encefalopatía por VIH), leucoencefalopatía multifocal progresiva, o síndrome de desgaste o *wasting syndrome*.

50

d) Procesos tumorales: sarcoma de Kaposi, linfoma de Burkitt, otros linfomas no-Hodgkin, especialmente linfoma inmunoblástico, linfoma cerebral primario o linfoma de células B, o carcinoma invasivo de cérvix.

No todos los pacientes infectados por VIH tienen SIDA. El criterio para diagnosticar el SIDA puede variar de región en región, pero el diagnóstico típicamente requiere:

55

- un recuento absoluto de las células T CD4+ menor a 200 por milímetro cúbico, o
- la presencia de alguna de las infecciones oportunistas típicas, causadas por agentes incapaces de producir enfermedad en personas sanas.

Después de la infección por el VIH, la progresión de la enfermedad clínica varía entre los individuos. Factores tales como la susceptibilidad del huésped, la genética y la función inmune, la atención sanitaria y co-infecciones, así como la variabilidad genética viral, pueden afectar el tiempo de progresión a SIDA. Los sujetos que padecen SIDA pueden, por tanto, ser clasificados de acuerdo con la velocidad de progresión de la enfermedad en los siguientes grupos:

60

- 5 - Progresores rápidos (PR): Un pequeño porcentaje de individuos infectados por VIH progresan rápidamente hacia el SIDA en los cuatro años posteriores a la infección primaria por VIH y se denominan “progresores rápidos” (PR). De hecho, es conocido que algunos individuos han progresado a SIDA y muerte dentro del primer año después de la infección primaria.
- 10 - Progresores lentos o lentoprogresores (LP): Un subgrupo de pacientes que han sido diagnosticados y seguidos en la unidad de VIH durante al menos 8 años, que presentan unas mediciones de linfocitos T CD4+ por encima de las 350 células/μL, y en los que la infección por VIH es asintomática durante todo este tiempo, es decir, que la infección es estable y no ha evolucionado hacia el estadio SIDA, se clasifican como “progresores lentos” o “lentoprogresores” (LP).
- 15 - No progresores de larga duración (NPLD): Otro subgrupo de individuos que están persistentemente infectados con el VIH, pero no muestran signos de progresión de la enfermedad por más de 12 años y permanecen asintomáticos se clasifican como “no progresores de larga duración” (NPLD). En estos individuos, parece que la infección por VIH se ha detenido en lo que respecta a la progresión de la enfermedad durante un período prolongado de tiempo. En algunas cohortes, los individuos que experimentan signos de progresión, pero cuyos parámetros clínicos y de laboratorio se mantienen estables durante largos períodos de tiempo, se clasifican como supervivientes a largo plazo (LTS).
- 20 - Otro subgrupo de sujetos que representan un porcentaje menor ha sido identificado recientemente. Se llaman “muy expuestos persistentemente seronegativos” (HEPS). Se trata de un pequeño grupo de individuos y se ha observado sólo en un grupo de prostitutas VIH-negativas en Kenia y en Gambia. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de estos sujetos presentan actividad linfoproliferativa, con linfocitos citotóxicos T (CTL) CD8+ específicos frente a VIH, cuando son estimuladas con péptidos de VIH, lo que sugiere que podría haber ocurrido una infección transitoria. Esto no ocurre en sujetos no expuestos. Es interesante que la especificidad del epítipo reconocido por los CTL difiere entre sujetos HEPS y sujetos seropositivos, y que en sujetos HEPS el mantenimiento de las respuestas inmunes parece ser dependiente de la exposición persistente al VIH.

1.1 Determinación del perfil genético

35 La etapa (i) del primer método de la invención consiste en determinar el perfil genético de al menos una variante génica humana asociada a la evolución de la infección por VIH presente en un gen en una muestra de dicho sujeto y obtener el perfil genético correspondiente.

40 El término “variante génica”, tal y como se utiliza en la presente descripción, incluye las mutaciones, polimorfismos y variantes alélicas. Una variante genética se encuentra entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones dentro de las especies.

45 En una realización particular, las variantes génicas utilizadas en la presente invención son variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH presentes en uno o más genes en una muestra de un sujeto infectado con el VIH. Ejemplos de variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH que se han relacionado con la no-progresión o protección incluyen HLA-B*27 y HLA-B*57, HLA-B*5701, CCR2 64I, CCR5 Δ32, SDF1 3'A y HLA-C; asimismo, también incluyen alelos que se han relacionado con una progresión rápida, como HLA-B*35, HLA-Cw04 y Cx3CR1. Asimismo, también se ha descrito una asociación entre la presencia de las variantes HLA-A*02:HLA-Cw*16, HLA-A*23:HLA-B*14, HLA-A*23:HLA-Cw*07, and HLA-A*30:HLA-Cw*03 con carga viral mayor del VIH.

55 En una realización particular, las variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH comprenden HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942), CCR5Δ32, o combinaciones de las mismas. En una realización preferida, dichas variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH son HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942) y CCR5Δ32.

60 El “antígeno leucocitario humano (HLA)” (HLA, acrónimo inglés de *human leukocyte antigen*) es el nombre que recibe el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, acrónimo inglés de *major histocompatibility complex*) en seres humanos. Son antígenos formados por moléculas que se encuentran en la superficie de casi todas las células de los tejidos de un individuo, y también en los glóbulos blancos (o leucocitos) de la sangre. Cumplen con la función de diferenciar lo propio de lo ajeno y aseguran la respuesta inmune, capaz de defender al organismo de algunos agentes extraños que generan infecciones. Este grupo de

genes reside en el cromosoma 6, y codifica para proteínas presentadoras de antígeno de la superficie celular. Los principales antígenos HLA son elementos esenciales para la función inmune. Las diferentes clases de HLA tienen diferentes funciones:

- 5 - HLA-A, HLA-B y HLA-C, y los genes minoritarios HLA-E, HLA-F y HLA-G, correspondientes a MHC de clase I, presentan péptidos del interior de la célula (incluyendo péptidos virales si los hubiera). Estos péptidos son producidos a partir de las proteínas digeridas por los proteasomas. En general, los péptidos son pequeños, de alrededor de 9 aminoácidos de longitud. La presencia de antígenos extraños en las moléculas HLA atrae a las células T *killer* (CD8 positivas o células T citotóxicas), que destruyen a las células que los presentan.
- 10 - HLAs (DP, DM, DOA, DOB, DQ y DR) que se corresponden a MHC de clase II, presentan antígenos del exterior celular a los linfocitos T. Estos antígenos particulares estimulan la multiplicación de las células T *helper* (CD4 positivas), que a su vez estimulan a las células B para que produzcan anticuerpos reactivos contra el antígeno específico. Los auto-antígenos son reprimidos por las células T supresoras.
- 15 - HLAs que se corresponden a MHC de clase III codifican componentes del sistema del complemento.

20 Se han descrito 673 alelos de genes capaces de producir 527 isoformas de HLA-A y 46 variantes nulas (base de datos IMGT/HLA). Además, se han descrito asociaciones entre la presencia de un determinado alelo de HLA-A en el genotipo de un sujeto y la susceptibilidad a padecer una enfermedad. Ejemplos no limitativos incluyen la asociación entre HLA-A*24 y espondilitis anquilosante, HLA-A*1 y/o HLA-A*24 y diabetes tipo-I, HLA-A*3 y hemocromatosis, HLA-A*3, HLA-A*24 y/o HLA-A*30 y miastenia gravis, HLA-A*26 y/o HLA-A*68 y leucemia de células T en adultos, HLA-A*3 y esclerosis múltiple, HLA-A*11 y una mayor susceptibilidad al virus del *Papilloma*, HLA-A*2 y susceptibilidad a sufrir abortos espontáneos. Asimismo, también se ha descrito una asociación entre la presencia de las variantes HLA-A*02:HLA-Cw*16, HLA-A*23:HLA-B*14, HLA-A*23:HLA-Cw*07, y HLA-A*30:HLA-Cw*03 con carga viral mayor del VIH.

30 Se han descrito cientos de alelos de genes capaces de producir isoformas de HLA-B. Además, se han descrito asociaciones entre la presencia de un determinado alelo de HLA-B en el genotipo de un sujeto y la susceptibilidad a padecer una enfermedad. Ejemplos no limitativos incluyen la asociación entre HLA-B*27 y espondiloartropatías como la espondilitis anquilosante, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, artritis reactiva, HLA-B*1502 y el síndrome Stevens-Johnson en respuesta al fármaco carbamazepina, HLA-B*53 y una mayor protección frente a la malaria. Asimismo, también se ha descrito una asociación entre la presencia de las variantes HLA-B*27 o HLA-B*57 y una tendencia a una progresión más lenta hacia SIDA, o HLA-B*35 y una tendencia a una progresión más rápida hacia SIDA.

40 Al igual que en el caso de los genes que codifican para HLA-A y HLA-B, también se han descrito numerosos alelos de genes que codifican para isoformas de HLA-C. Asimismo, también se ha observado que la presencia de ciertos alelos de HLA-C está asociada con determinadas enfermedades. Ejemplos incluyen, sin limitación, HLA-Cw1 y bocio multinodular, y HLA-Cw16 y leucemia crónica linfocítica. El alelo HLA-Cw04 se ha asociado con una progresión más rápida hacia SIDA, mientras que el SNP rs9264942 se ha asociado con una progresión más lenta. El SNP rs9264942 está localizado en el gen HLA C, y se corresponde con la secuencia:

GTCCACAAGAGACAGACCCACTTCC[C/T]AGGCACTGTGGACTTTCTGAGCCC

50 en donde la variante alélica relacionada con LP es "T", tanto en heterocigosis como en homocigosis.

El receptor de quimiocinas C-C de tipo 5, también denominado CCR5 o CD195, es una proteína de membrana que está involucrada en el sistema inmune actuando como un receptor para quimiocinas. Los ligandos naturales de este receptor son RANTES (una citoquina quimiotáctica también conocida como CCL5), las proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP) 1 α y 1 β (también conocidas como CCL3 y CCL4), y CCL3L1. CCR5 se expresa predominantemente en las células T, macrófagos, células dendríticas y la microglía. Es probable que CCR5 desempeñe un papel en la respuesta inflamatoria a la infección, aunque su función exacta en la función inmune normal, no está claro. El VIH utiliza comúnmente CCR5 y/o CXCR4 como co-receptores para entrar en sus células diana. Mientras CCR5 tiene múltiples variantes en su región de codificación, la eliminación de un segmento de 32 pb da como resultado un receptor no funcional, lo que impide la entrada del VIH, dos copias de este gen ofrece una mayor protección contra la infección por el VIH, aunque la protección no es absoluta. Este alelo se encuentra en alrededor del 10% de los europeos, pero es raro en los africanos y los asiáticos. Múltiples estudios de personas infectadas

por VIH han demostrado que la presencia de una copia de esta mutación, llamada CCR5Δ32 retrasa la progresión de la enfermedad del SIDA en alrededor de 2 años.

5 Con el fin de determinar el perfil genético o genotipar dichas variantes génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto asociadas a la evolución de la infección por VIH mediante el método de la invención, en una primera etapa se procede a extraer el ácido nucleico de una muestra biológica del sujeto a analizar.

10 La extracción del ácido nucleico (p.ej. DNA) a partir de una muestra biológica procedente de un sujeto se puede llevar a cabo por métodos convencionales utilizando, opcionalmente, productos comerciales útiles para extraer dicho ácido nucleico. Prácticamente cualquier muestra biológica que contiene ácido nucleico puede ser utilizada para la puesta en práctica de la invención; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha muestra biológica puede ser una muestra de biopsia, tejidos, células o fluidos, por ejemplo sangre, saliva, plasma, suero, secreciones, leche, etc. En una realización particular, dicha muestra biológica es sangre.
15 En una realización preferida, dicha muestra biológica es una muestra de sangre periférica.

20 En una realización particular, una vez obtenido el ácido nucleico, se amplifican aquellas regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variantes génicas a identificar. Como se ha mencionado previamente, el término "variante génica", tal como se utiliza en esta descripción, incluye polimorfismos (e.g., SNPs), mutaciones y variantes alélicas. Para amplificar las regiones de ácido nucleico que contienen las variantes génicas a identificar se utilizan unos oligonucleótidos cebadores específicos que amplifican los fragmentos del genoma que pueden contener dichas variantes génicas. Dichos oligonucleótidos cebadores se describen detalladamente más adelante.

25 Así, las regiones de DNA que contienen las variantes génicas a identificar (regiones DNA diana) se someten a una reacción de amplificación para obtener unos productos de amplificación que contienen las variantes génicas a identificar. Aunque puede utilizarse cualquier técnica o método que permita la amplificación de todas las secuencias de DNA que contienen las variantes génicas a identificar, en una realización particular, dichas secuencias se amplifican mediante una reacción de amplificación en cadena
30 de la polimerasa (PCR).

35 Para la determinación mediante PCR de las variantes génicas del método de la invención, se requiere el empleo de unos pares de oligonucleótidos cebadores o iniciadores capaces de amplificar dichas regiones DNA diana que contienen las variantes génicas a identificar según se ha explicado anteriormente. Prácticamente puede utilizarse cualquier par de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de dichas regiones DNA diana, preferentemente, pares de oligonucleótidos cebadores que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones de amplificación. De este modo, utilizando los pares de oligonucleótidos cebadores y las condiciones apropiadas, se pueden amplificar
40 todas las regiones DNA diana necesarias para la determinación del perfil genético para dichas variantes génicas a analizar con el mínimo número posible de reacciones. En una realización particular, dichos oligonucleótidos cebadores se seleccionan entre los oligonucleótidos cebadores identificados como SEQ ID NO: 1-10 en la Tabla 1.

Cebador	Variante génica	Secuencia (5'-3')
B27F	HLA B*27	CTACGTGGACGACACGCT (SEQ ID NO: 1)
B27R	HLA B*27	AGTCTGTGCCCTTGCCCTTGC (SEQ ID NO: 2)
B57-1F	HLA B*5701	GTCTCACATCATCCAGGT (SEQ ID NO: 3)
B57-2R	HLA B*5701	ATCCTTGCCGTCGTAGGCCGG (SEQ ID NO: 4)
B57-3R	HLA B*5701	ATCCTTGCCGTCGTAGGCAG (SEQ ID NO: 5)
B57-4R	HLA B*5701	CGCCTCCCACTTGCGCTGGG (SEQ ID NO: 6)
HLAC-F	HLA C (rs9264942)	CACAGTCCCAATTCCTTGATTGAG (SEQ ID NO: 7)
HLAC-R	HLA C (rs9264942)	CTGTGGAAGGCAGGCTGAGAC (SEQ ID NO: 8)
CCR5-F	CCR5Δ32	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC (SEQ ID NO: 9)
CCR5-R	CCR5Δ32	CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTTCG (SEQ ID NO: 10)

45 Tabla 1: Cebadores específicos para la amplificación de las variantes génicas humanas B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942) y CCR5Δ32.

50 En una realización preferida, la variante génica humana B*27 se amplifica mediante el par de oligonucleótidos cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, la

- 5 variante génica humana HLA B*5701 se amplifica mediante el par de oligonucleótidos cebadores de secuencia SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6. En otra realización preferida, la variante génica humana HLA C (rs9264942) se amplifica mediante el par de oligonucleótidos cebadores de secuencia SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En otra realización preferida, la variante génica humana CCR5Δ32 se amplifica mediante el par de oligonucleótidos cebadores de secuencia SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
- 10 En una realización particular, para la determinación del polimorfismo rs9264942 en el gen HLA-C, los productos de la PCR resultantes se digieren con la enzima de restricción *A₁WNI*. Una "T" en la posición del SNP da lugar a un fragmento no digerido, mientras que una C en la posición del SNP da lugar a dos fragmentos después de la digestión con *A₁WNI*.
- 15 Posteriormente, los productos de PCR pueden resolverse en un gel de agarosa y visualizarse con luz ultravioleta.
- 20 En otra realización particular del método, las secuencias de dichas variantes génicas se amplifican mediante una amplificación multiplex, lo cual permite genotipar simultáneamente dichas variantes génicas humanas a identificar presentes en uno o más genes.
- 25 Para la realización de una amplificación multiplex se requiere el empleo de unos pares de oligonucleótidos cebadores o iniciadores capaces de amplificar dichas regiones DNA diana que contienen las variantes génicas a identificar según se ha explicado anteriormente. Prácticamente puede utilizarse cualquier par de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de dichas regiones DNA diana, preferentemente, pares de oligonucleótidos cebadores que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones de amplificación. De este modo, utilizando los pares de oligonucleótidos cebadores y las condiciones apropiadas, se pueden amplificar todas las regiones DNA diana necesarias para el genotipado de dichas variantes génicas a analizar con el mínimo número posible de reacciones. En una realización particular, dichos oligonucleótidos cebadores se seleccionan entre los oligonucleótidos cebadores identificados como SEQ ID NO: 1-10.
- 30 Una vez que se han amplificado las secuencias de DNA que contienen las variantes génicas a identificar, el método de la invención comprende la etapa de determinar el perfil genético de dichas variantes. En una realización particular de la invención, dicha etapa de determinación del perfil genético se realiza simultáneamente mediante un análisis con DNA-chips, por ejemplo, utilizando un DNA-chip apropiado, tal como el DNA-chip proporcionado por esta invención (DNA-chip de la invención, cuyas características se mencionan más adelante), es decir, por hibridación con sondas específicas para dichas variantes génicas humanas. Adicional, o alternativamente, dicha determinación del perfil genético puede realizarse mediante la secuenciación de dichos productos de amplificación.
- 35 Así, si se desea, durante la reacción de amplificación, puede llevarse a cabo el marcaje de los productos de amplificación con el fin de poder detectar posteriormente la hibridación entre las sondas presentes en el DNA-chip de la invención, inmovilizadas en el soporte, y los fragmentos de DNA diana que contienen las variantes génicas a detectar. El marcaje de los productos de amplificación puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, incorporando un nucleótido marcado durante la reacción de amplificación o bien utilizando cebadores marcados. Dicho marcaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos, por ejemplo, ³³P, ¹²⁵I, etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia. Alternativamente, dicho marcaje puede ser indirecto mediante el empleo de métodos químicos, enzimáticos, etc.; a modo ilustrativo, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina conjugada con un fluorocromo (marcador), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, biotina (indicador), efectuándose la lectura mediante fluorimetría, etc., o bien, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una enzima (marcador), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, digoxigenina (indicador), etc., transformándose el sustrato de la enzima en un producto luminoso o fluorescente y, efectuándose la lectura mediante quimio-luminiscencia, fluorimetría, etc.
- 40 En una realización particular, el marcaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de un nucleótido marcado directa o indirectamente con uno o más fluoróforos. En otra realización particular, el marcaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de cebadores marcados directa o indirectamente con uno o más fluoróforos.
- 45 La hibridación de los productos de fragmentación con las sondas capaces de detectar las variantes génicas correspondientes depositadas en un soporte (DNA-chip de la invención) se lleva a cabo por
- 50
- 55
- 60

métodos convencionales utilizando dispositivos convencionales. En una realización particular, la hibridación se lleva a cabo en una estación automática de hibridación. Para llevar a cabo la hibridación, los productos de fragmentación se ponen en contacto con dichas sondas (DNA-chip de la invención) bajo condiciones que permiten la hibridación entre dichos productos de fragmentación y dichas sondas.

5

Finalizado el proceso de hibridación se procede a la captura de la imagen y a su cuantificación. Para ello, la imagen del DNA-chip hibridado y revelado es recogida con un dispositivo apropiado, por ejemplo, un escáner, procediéndose, a continuación, a cuantificar los valores absolutos de fluorescencia de cada sonda así como del ruido de fondo. Por tanto, en una realización particular, tras la hibridación, o tras las reacciones de amplificación o ligación post-hibridación, el DNA-chip hibridado y revelado se introduce en un escáner donde es sometido a un escaneado para cuantificar la intensidad del marcaje en los puntos donde se ha producido la hibridación. Aunque prácticamente cualquier escáner puede ser utilizado, en una realización particular, dicho escáner es un escáner de fluorescencia confocal. En este caso, el DNA-chip se introduce en el escáner y se escanea la señal emitida por el marcaje al ser excitado por un láser, cuantificándose la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación. En una realización particular, dicho escáner es un escáner de luz blanca. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de escáneres que pueden ser utilizados según la presente invención son escáneres de Axon, Agilent, Perkin Elmer, etc. El análisis de los datos y su interpretación se lleva a cabo, en general, mediante el empleo de programas informáticos (software).

10

15

20

Una vez determinado el perfil genético del sujeto infectado por VIH, se determina la probabilidad del mismo a ser considerado lentoprogresor.

1.2 Determinación de la probabilidad de un sujeto a ser considerado lentoprogresor

25

Posteriormente, en una segunda etapa (ii), el primer método de la invención consiste en determinar la probabilidad $P(LP / Z, T > t)$ mediante la ecuación [1]:

30

$$P(LP / Z, T > t) = \frac{P(LP / Z)}{P(T > t / Z)} \quad [1]$$

donde

35

$P(LP / Z, T > t)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i) en función de un tiempo libre de enfermedad T mayor que cierto tiempo t ;
 $P(LP / Z)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i); y
 $P(T > t / Z)$ representa la probabilidad de que el tiempo libre de enfermedad (T) sea mayor que cierto tiempo t para el perfil genético determinado en la etapa (i).

40

El perfil genético determinado Z se establece tal y como se ha descrito en el apartado anterior. En una realización particular, dicho perfil genético Z se determina para las variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH que comprenden HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942), CCR5Δ32 o combinaciones de las mismas. En una realización particular, dicho perfil genético Z se determina para las variantes génicas humanas HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942) y CCR5Δ32.

45

El término “tiempo libre de enfermedad”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al tiempo transcurrido desde la detección del VIH hasta el momento en el que ocurre la diagnosis del SIDA o, en el caso de no haber ocurrido dicho diagnóstico, hasta el momento en que se pone en práctica el primer método de la invención.

50

Determinación de $P(LP / Z)$

55

En una realización particular, la probabilidad de lentoprogresión (LP) para un perfil genético determinado Z [$P(LP / Z)$] se determina mediante regresión logística multivariante.

60

Los modelos de regresión logística son modelos estadísticos estándar e implementados en numerosos paquetes estadísticos que permiten estimar la relación existente entre una variable respuesta dicotómica (con sólo dos categorías; en el caso de la presente invención, se trata de LP: sí/no) y una o más variables explicativas independientes, o covariables (el caso de la presente invención, se trata de cada uno de los marcadores genéticos). Como resultado, este tipo de modelos permiten cuantificar la magnitud de la relación existente entre cada una de las covariables y la variable dependiente o respuesta. Dicha magnitud de asociación viene determinada por los coeficientes de regresión estimados por el modelo. Concretamente la especificación del modelo de regresión logística viene dada por la ecuación [2]:

$$\log \left[\frac{p(LP=1)}{p(LP=0)} \right] = \beta_0 + \beta Z \quad [2]$$

5

donde

- 10 $p(LP = 1)$ representa la probabilidad de lentoprogresión
 $p(LP = 0)$ representa la probabilidad de no lentoprogresión (equivalentemente, probabilidad de progresión)
 β_0 representa el término independiente o intercepto del modelo de regresión, indicativo de la probabilidad de lentoprogresión cuando ninguno de los marcadores estudiados está presente.
 βZ representa de manera sintética (vectorial) los términos aditivos formados por el producto de las variables explicativas (presencia o no de cada uno de los marcadores genéticos estudiados) y su correspondiente efecto (β_i). Es decir, en nuestro caso particular $\beta Z = \beta_1 Z_1 + \beta_2 Z_2 + \beta_3 Z_3 + \beta_4 Z_4$, con $Z = (Z_1, Z_2, Z_3, Z_4) = (\text{HLA-B27}, \text{HLA-B57*01}, \text{HLA-C(rs9264942)}, \text{CCR5}\Delta 32)$. Se denomina predictor lineal y da cuenta del efecto de los perfiles genéticos en la lentoprogresión.

20 Además, este tipo de modelos permite clarificar la existencia de interacción y confusión entre covariables respecto a la variable dependiente (obteniendo la *odds ratio* para cada una de las covariables ajustando por las demás). Esta metodología también permite clasificar individuos dentro de las categorías de la variable dependiente (LP: sí/no), según la probabilidad que tenga de pertenecer a una de ellas dada la presencia de determinadas covariables.

25 En una realización preferida, los coeficientes de regresión correspondientes a las variantes génicas son los siguientes:

- HLA-B27: -0,2693, (p-valor = 0,73552)
- HLA-B57*01: 1,2990, (p-valor = 0,00512)
- HLA-C (rs9264942): 1,1509, (p-valor = 0,00188)
- 30 - CCR5Δ32: 1,0074, (p-valor = 0,01941)

en donde el intercepto (β_0) es -2,2141.

Determinación de $P(T > t / Z)$

35

En otra realización particular, la probabilidad de que el tiempo libre de enfermedad sea mayor que cierto tiempo t para un perfil genético determinado Z [$P(T > t / Z)$] se determina mediante análisis de supervivencia con datos censurados, preferiblemente con modelos de regresión de Cox.

40

El análisis de supervivencia con datos censurados es ampliamente utilizado en biomedicina cuando interesa estudiar el riesgo de ocurrencia de un determinado evento de interés (el caso de la presente invención, la progresión de la enfermedad) en función del tiempo t y de un conjunto de covariables (perfil genético Z). Así, siguiendo la terminología propia del análisis de supervivencia, los casos en los que no se ha observado la progresión del sujeto infectado por VIH al final del seguimiento se consideran observaciones censuradas. Como resultado, el ajuste de este tipo de modelos permite la estimación de la función de supervivencia para cada tiempo t [$P(T > t / Z)$], la probabilidad de que el evento de interés (la progresión de la enfermedad) se produzca en un tiempo T superior a t (medido desde el inicio del seguimiento del paciente) dado el perfil genético Z . Dado que la función $P(T > t / Z)$ para un perfil genético Z determinado es decreciente y divide a la probabilidad inicial $P(LP / Z)$, a mayor tiempo sin progresar, más se incrementará su probabilidad inicial dada por el perfil genético.

50

En una realización preferida, los coeficientes en el ajuste de regresión de Cox correspondientes a las variantes génicas son los siguientes:

- HLA B57*01: -1,1695, (p-valor=0,105)
- 55 - CCR5Δ32: -0,13719, (p-valor=0,713)
- HLAC: -0,47944, (p-valor=0,093)
- HLA B27: 0,01707, (p-valor=0,962)

60

Como el experto en la materia entenderá, existen otros métodos para la modelización de datos de supervivencia. El primer método de la invención podría realizarse utilizando otros modelos para el análisis de supervivencia, como por ejemplo los modelos de fallo acelerado. La elección del modelo de Cox se

debe a su gran flexibilidad (no asume ninguna forma particular para la función de riesgo de base) y robustez, además de su disponibilidad en los paquetes estadísticos.

5 Una vez calculadas las probabilidades $P(LP / Z)$ y $P(T > t / Z)$, la probabilidad del sujeto a ser considerado lentoprogresor se determina mediante la ecuación [1]:

$$P(LP / Z, T > t) = \frac{P(LP / Z)}{P(T > t / Z)} \quad [1]$$

10

en donde si dicha probabilidad es mayor que 0,5 entonces el sujeto es clasificado como lentoprogresor.

2. Segundo y tercer métodos de la invención

15 El primer método de la invención descrito anteriormente es útil para predecir la probabilidad de un sujeto infectado por VIH de ser lentoprogresor. De acuerdo con la velocidad de progresión, el médico podría diseñar una terapia personalizada para dicho sujeto.

20 Por lo tanto, en un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con un método para seleccionar un sujeto infectado por VIH para una terapia personalizada, en adelante "segundo método de la invención", que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor de acuerdo al método según el primer método de la invención, en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento si es clasificado como "no lentoprogresor".

25 Asimismo, en un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con un método para seleccionar una terapia personalizada para un sujeto infectado por VIH en necesidad de tratamiento, en adelante "tercer método de la invención", que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor de acuerdo al método según el primer método de la invención, en donde se selecciona una terapia personalizada para dicho sujeto si este es clasificado como "no lentoprogresor".

30

El término "terapia" o "terapia personalizada" o "tratamiento" o "tratamiento personalizado", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un tratamiento terapéutico en donde el objetivo es prevenir la progresión a SIDA o reducir la tasa de progresión a SIDA. Resultados clínicos beneficiosos o deseables incluyen, sin limitación, unos niveles de linfocitos T CD4 superiores a 350 células/ μ L, unos niveles de carga viral (CV) inferiores a 10000 copias/mL de ARN-VIH, y no presentar los síntomas y afecciones descritos anteriormente en relación con la clasificación de la infección por VIH (categorías A, B y C).

35

40 En una realización particular, la terapia es una terapia antirretroviral. La terapia antirretroviral se decide de acuerdo a las recomendaciones de las diferentes guías nacionales e internacionales, como: Gesida-PNS (Grupo de Estudio del SIDA de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Plan Nacional sobre el SIDA), DHHS (Department of Human Health Services de EE UU), IAS-UP (International AIDS Society-USA Panel), EACS (European AIDS Clinical Society), BHIVA (British HIV Association), y MSF (Ministère de la Santé, la Jeunesse et les Sports de Francia). La terapia antirretroviral incluye, sin limitación, a todos los fármacos comercializados hasta la fecha, como inhibidores de proteasa, inhibidores de la fusión, inhibidores de la integrasa, agentes específicos de co-receptores, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos e inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos. La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), es una combinación de tres o más fármacos antirretrovirales. El término "TARGA" tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una combinación de agentes antirretrovirales altamente activos y normalmente comprende tres fármacos. Ejemplos no limitativos de inhibidores de la transcriptasa inversa incluyen inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos como zidovudina (AZT, Retrovir), didanosina (ddl, Videx), estavudina (d4T, Zerit), lamivudina, (3TC, Epivir), abacavir (ABC, Ziagen), tenofovir (TDF, Viread), combivir (CBV, combinación de AZT y 3TC), e inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos como nevirapina (NVP, Viramune), delavirdina (DLV, rescriptor), efavirenz (EFV, sustiva). Ejemplos no limitativos de inhibidores de proteasa incluyen saquinavir (SQV, Invirase), ritonavir (RTV, Norvir), indinavir (IDV, Crixivan), nelfinavir (NFV, Viracept), fosamprenivir (FPV, Lexiva), kaletra (lopinavir y ritonavir) y fortovase (saquinavir en formulación de gelatina blanda).

50

55

3. Kits de la invención

60

La presente invención también contempla la preparación de kits para la implementación de los métodos de acuerdo con la presente invención.

Por tanto, en un cuarto aspecto, la presente invención se relaciona con un kit, en adelante "kit de la invención", que comprende los reactivos necesarios para genotipar múltiples variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH, en donde dichas variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH se seleccionan del grupo formado por HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942), CCR5 Δ32, y combinaciones de las mismas.

Kits adecuados incluyen diversos reactivos para uso de acuerdo con la presente invención en recipientes adecuados y materiales de embalaje, incluidos los tubos, viales, y celofán y paquetes de moldeado por soplado.

Los materiales adecuados para su inclusión en un kit ejemplar de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de los siguientes: pares de cebadores específicos de genes de PCR (oligonucleótidos) que hibridan con el ADN o dominios de cDNA de secuencia que flanquean las variantes génicas de interés (descritas en relación con el primer método de la invención); reactivos capaces de amplificar una secuencia específica de dominio en cualquiera de ADN genómico o de ADNc sin el requisito de la realización de PCR; reactivos necesarios para discriminar entre los diversos alelos posibles en la secuencia de los dominios amplificado por PCR o por amplificación de tipo no-PCR (por ejemplo, endonucleasas de restricción, los oligonucleótidos que recocido preferentemente a un alelo del polimorfismo, incluyendo aquellos modificados para contener enzimas o grupos fluorescentes químicos que amplifican la señal del oligonucleótido y hacer discriminación de alelos más robustas); reactivos necesarios para los productos físicamente separados derivados de los diversos alelos (por ejemplo agarosa o poliácridamida y un tampón para ser utilizado en la electroforesis, columnas de HPLC, geles SSCP, geles formamida).

25 **4. Usos del kit de la invención**

En un quinto aspecto, la presente invención se relaciona con un uso de un kit de la invención, en adelante "primer uso del kit de la invención", para predecir si un sujeto infectado por VIH es lentoprogresor.

En un sexto aspecto, la presente invención se relaciona con un uso de un kit de la invención, en adelante "segundo uso del kit de la invención", para seleccionar un sujeto infectado por VIH para una terapia personalizada que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor, en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento si es clasificado como "no lentoprogresor".

Asimismo, en un séptimo aspecto, la presente invención se relaciona con un uso de un kit de la invención, en adelante "tercer uso del kit de la invención", para seleccionar una terapia personalizada para un sujeto infectado por VIH en necesidad de tratamiento, que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor, en donde se selecciona una terapia personalizada para dicho sujeto si este es clasificado como "no lentoprogresor".

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

45 **EJEMPLO 1**

Materiales y métodos

Pacientes

Se estudiaron 390 sujetos infectados de VIH, que fueron clasificados atendiendo a la definición de lentoprogresores (ver más abajo). Dado que para clasificar a un individuo como lentoprogresor debe disponerse de 8 años o más de seguimiento, se establecieron dos grupos de pacientes atendiendo al año de diagnóstico:

- 55 - Grupo 1: Pacientes diagnosticados antes de 2004 (tiempo de seguimiento igual o superior a 8 años),
- Grupo 2: Pacientes diagnosticados entre 2004 y 2009 (tiempo de seguimiento inferior a 8 años).

Indicador de progresión

60 Los sujetos son clasificados como lentoprogresores (LP) si presentan las siguientes características:

- No SIDA
- CD4s > 350 células/ μ L
- CV < 10000 copias/mL de ARN-VIH

- No han recibido tratamiento antirretroviral para la infección por VIH.
- Más de 7 años de seguimiento desde el diagnóstico

Extracción de ADN

5

Se recogió una muestra de sangre periférica (10 ml con anticoagulante EDTA) de pacientes infectados por VIH-1, y se aisló el ADN genómico con el kit Flexi Gene DNA Kit (QIAGEN, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10 Determinación de marcadores moleculares

Para la determinación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de HLA-B*27 se utilizaron los cebadores descritos en Sayer *et al.* (1999, Mol Pathol 52:300-1) [B27F (SEQ ID NO: 1) y B27R (SEQ ID NO: 2), Tabla 1]. En un volumen final de 25 µl, y siguiendo un protocolo de amplificación de:

15

- 1 min a 96 °C;
- 4 ciclos de: 25 s a 96 °C, 45 s a 70 °C, y, 45 s a 72 °C;
- 24 ciclos de: 25 s a 96 °C, 50 s a 65 °C, y, 45 s a 72 °C;
- 8 ciclos de: 25 s a 96 °C, 1 min a 55 °C, y, 1 min 20 s a 72 °C;
- 7 min a 72 °C.

20

Los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa 4% y se visualizó en un transiluminador ultravioleta.

25

Para la determinación mediante PCR de HLA-B*5701, se empleó la técnica descrita y validada en Martin *et al.* (2005, Tissue Antigens 65:571-4). Se utilizaron 4 cebadores específicos para amplificar la región HLA-B [B57-1F (SEQ ID NO: 3), B57-2R (SEQ ID NO: 4), B57-3R (SEQ ID NO: 5) y B57-4R (SEQ ID NO: 6), Tabla 1], y otros dos cebadores para el gen HGH [HGH-I (SEQ ID NO: 11) y HGH-II (SEQ ID NO: 12)] como control interno de amplificación. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, de acuerdo al siguiente protocolo de amplificación:

30

- 15 min a 95 °C;
- 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 1 min 30 s a 60 °C, y 1 min 30 s a 72 °C;
- 10 min a 72 °C.

35

Los productos finales de la PCR se visualizaron en un transiluminador ultravioleta en un gel de agarosa al 4%.

Para la amplificación del polimorfismo rs9264942 en el gen HLA-C se utilizaron los cebadores descritos en van Manen *et al.* (2009, AIDS 23:19-28) [HLAC-F (SEQ ID NO: 7) y HLAC-R (SEQ ID NO: 8), Tabla 1]. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, de acuerdo al siguiente protocolo de amplificación:

40

- 5 min a 95 °C;
- 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 54 °C, y 1 min 30 s a 72 °C;
- 5 min a 72 °C.

45

Los productos de la PCR resultantes se digirieron con la enzima de restricción *A**l**u**N**I* (incubación a 37 °C durante 2 h) y se analizaron en un gel de agarosa al 2%. Una "T" en la posición del SNP da lugar a un fragmento no digerido de 330 pb, mientras que una C en la posición del SNP da lugar a dos fragmentos, uno de 133 pb y otro de 197 pb después de la digestión con *A**l**u**N**I*.

50

Para detectar la delección de 32 pb en el gen CCR5 (CCR5Δ32) se utilizó el protocolo descrito en Huang *et al.* (1996, Nat Med 2:1240-3) [CCR5-F (SEQ ID NO: 9) y CCR5-R (SEQ ID NO: 10), Tabla 1]. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, de acuerdo al siguiente protocolo de amplificación:

55

- 5 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, y 1 min 30 s a 72 °C;
- 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, y 45 s a 72 °C;

donde la amplificación de la región específica puede dar lugar a la amplificación de dos fragmentos, uno que corresponde a 189 pb del alelo normal y un fragmento de 154 pb para el alelo que presenta la delección. Los fragmentos obtenidos se resuelven en un gel de agarosa al 4% y se visualizan en un transiluminador ultravioleta.

60

Métodos estadísticos

5 Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico R (<http://cran.r-project.org>), concretamente se usaron los paquetes *stats* (ajuste de modelos lineales generalizados logísticos) y *survival* (ajuste de modelos de supervivencia de Cox).

10 Para los pacientes diagnosticados antes de 2004 (Grupo 1), no se conoce el tiempo exacto hasta la progresión, pero sí si éste fue igual o superior a 8 años, mientras que para los pacientes diagnosticados a partir de 2004 (Grupo 2) se conoce el tiempo exacto transcurrido desde el diagnóstico, pero éste no ha alcanzado los 8 años necesarios para determinar si el individuo es lentoprogresor en caso de no haber progresado, por lo que en muchos casos el valor como lentoprogresor es desconocido. Dadas las peculiaridades de esta base de datos en cuanto a información disponible, el estudio de la lentoprogresión requiere un análisis adaptado a la naturaleza de dichos datos.

15 Con los datos del primer grupo (Grupo 1, periodo de diagnosis: 1982-2003, n=274) se ajustó un modelo de regresión logística multivariante, utilizando como covariables los marcadores moleculares disponibles y la lentoprogresión (LP: sí/no) como variable respuesta.

20 Como se ha comentado previamente, en el Grupo 2 (periodo de diagnosis: 2004-2009, n=126) hay pacientes con tiempo de seguimiento insuficiente para determinar su condición como lentoprogresores (concretamente aquellos que no han progresado al final de seguimiento).

25 A continuación, se detalla un método para imputar su futura condición respecto a la lentoprogresión basado en el primer método de la invención.

30 El método de imputación tiene en cuenta tanto el perfil genético como el tiempo libre de enfermedad observado de cada paciente (inferior a ocho años) de manera que la probabilidad de lentoprogresión dada por su perfil genético se ve aumentada o disminuida según el tiempo que lleve el paciente sin progresar (a mayor tiempo sin progresar, más se incrementará su probabilidad inicial dada por el perfil genético). Matemáticamente, el procedimiento de imputación descrito puede escribirse como se ha comentado anteriormente por:

35
$$P(LP / Z, T > t) = \frac{P(LP / Z)}{P(T > t / Z)} \quad [1]$$

40 donde Z es el perfil genético y T el tiempo de seguimiento libre de enfermedad. A continuación se detalla el método para la obtención de $P(LP / Z, T > t)$, a partir de las cantidades estimables $P(LP / Z)$ y $P(T > t / Z)$:

- 45 A. La probabilidad de lentoprogresión (LP) dado cierto perfil genético, $P(LP / Z)$, se estima usando el score pronóstico obtenido para el periodo anterior mediante regresión logística.
- B. La probabilidad inicial de cierto perfil genético dada por $P(LP / Z)$ es corregida según el tiempo que el paciente lleve sin progresar. Para esto, se divide $P(LP / Z)$ por la probabilidad de que el tiempo libre de enfermedad T sea mayor que cierto tiempo t dado cierto perfil genético Z , $P(T > t / Z)$. Las cantidades $P(T > t / Z)$ se estiman mediante técnicas de la rama de la estadística conocida como análisis de supervivencia con datos censurados, concretamente modelos de regresión de Cox.

50

Resultados

55 El modelo de regresión logística ajustado para los pacientes del Grupo 1 proporciona un *score* pronóstico, asignando diferentes probabilidades de lentoprogresión para los diferentes perfiles genéticos de los pacientes [$P(LP / Z)$; Z = perfil genético].

60 Mediante el mecanismo dado por la ecuación [1] se calcula la probabilidad de lentoprogresión para los pacientes con seguimiento incompleto. A continuación, se clarifica el procedimiento de ponderación de las probabilidades iniciales de lentoprogresión definido en B mediante la comparación de dos pacientes del ejemplo utilizado.

Se toman dos pacientes (P1 y P2) del Grupo 2 con ninguno de los marcadores genéticos estudiados (mismo perfil genético Z) pero con tiempo de seguimiento diferente ($t_1 = 2$ años y $t_2 = 6$ años respectivamente) durante el cual no se ha observado que hayan progresado. La probabilidad de ser LP

estimada en el Grupo 1 para este perfil genético Z (ninguno de los marcadores genéticos está presente) es igual a 0,10 (ver Tabla 2).

- 5 Dado que $P(T > t / Z)$ es una función decreciente, mediante el procedimiento explicado en B se ha obtenido, $P(T > t_1 / Z) = 0,35$ y $P(T > t_2 / Z) = 0,11$, y en consecuencia:
- $P_{P1}(LP / Z, T > t_1) = 0,10/0,35 = 0,29$, y
 - $P_{P2}(LP / Z, T > t_2) = 0,10/0,11 = 0,91$.

Perfil Genético (HLA-B27, HLA-B*5701, CCR5Δ32, HLA-C)		Probabilidad de lentoprogresor $P(LP / Z)$
No marcadores genéticos	(0,0,0,0)	0.10
1 marcador genético	(1,0,0,0)	0.08
	(0,1,0,0)	0.29
	(0,0,1,0)	0.23
	(0,0,0,1)	0.26
2 marcadores genéticos	(1,1,0,0)	0.23
	(0,1,1,0)	0.52
	(0,0,1,1)	0.49
	(0,1,0,1)	0.56
	(1,0,1,0)	0.19
	(1,0,0,1)	0.21
3 marcadores genéticos	(1,1,1,0)	0.46
	(0,1,1,1)	0.78
	(1,1,0,1)	0.49
	(1,0,1,1)	0.42
4 marcadores genéticos	(1,1,1,1)	0.73

- 10 Tabla 2: Probabilidades estimadas para lentoprogresión de cada perfil genético derivado de la regresión logística de acuerdo a los marcadores genéticos HLA-B*5701, CCR5Δ32, HLA-C y HLA-B*27 (++)

- 15 Como puede apreciarse en este caso concreto, la probabilidad inicial se pondera de manera que a igualdad de perfil genético se asigna mayor probabilidad de LP a aquellos que llevan más tiempo sin progresar.

Nombre Variable	Interpretación	Tipo	Codificación
id	Código indicador de paciente	Numérica	
HLA_B5701	Marcador HLA-B5701	Binaria	0 = Ausencia 1 = Presencia
CCR5Δ32	Marcador CCR5Δ32	Binaria	0 = Ausencia 1 = Presencia
HLA_B27	Marcador HLA-B27	Binaria	0 = Ausencia 1 = Presencia
HLA_C	Marcador HLA-C	Binaria	0 = Ausencia 1 = Presencia
t	Tiempo de seguimiento (no se ha observado progresión)	Numérica	En meses
p_log	$P(LP / Z)$ obtenida con datos 1982-2003 (regresión logística)	Numérica	Mínimo = 0 Máximo = 1
p_cox	$P(LP > t / Z)$ obtenida con datos 2004-2009 (regresión de Cox)	Numérica	Mínimo = 0 Máximo = 1
p_imput	$P(LP / Z, T > t)$ Probabilidad estimada de LP	Numérica	Mínimo = 0 Máximo = 1
LP_imput	Condición de LP asignada a pacientes con seguimiento incompleto en base a $p_imput > 0.5$	Binaria	0 = Progresor 1 = LentoProgresor

Tabla 3: Códigos e interpretación de las variables.

5 Una vez determinadas las probabilidades $P(LP / Z, T > t)$, el mecanismo de imputación resultante identifica al paciente como futuro lentoprogresor si la probabilidad de ser lentoprogresor (LP) calculada mediante la expresión [1] es mayor que 0,5 y si la probabilidad estimada es menor o igual que 0,5 el paciente se considerará como progresor.

10 En el ejemplo estudiado con el Grupo 2, de los 25 pacientes potencialmente lentoprogresores por no haber progresado al cierre del estudio (Tabla 4), con el método proporcionado por esta invención, se estima que 15 pacientes serán lentoprogresores mientras que los 10 restantes progresarán antes de que transcurran 8 años desde su diagnóstico.

15 El análisis presentado permite explotar al máximo la información disponible en la base de datos para el estudio de la lentoprogresión, tomando en consideración de manera adecuada la información de cada paciente, aunque ésta sea incompleta.

id	HLA_B5701	CCR5Δ32	HLA_B27	HLA_C	t	p_log	p_cox	p_imput	LP_imput
1	0	0	0	0	70	0,10	0,11	0,90	1
2	0	0	0	0	72	0,10	0,11	0,90	1
3	0	0	0	1	65	0,26	0,25	1,00	1
4	0	0	0	0	83	0,10	0,06	1,00	1
5	0	0	0	0	63	0,10	0,11	0,90	1
6	0	0	0	0	51	0,10	0,13	0,76	1
7	0	0	0	1	50	0,26	0,28	0,91	1
8	0	1	0	0	50	0,23	0,10	1,00	1
9	1	0	0	0	62	0,29	0,51	0,57	1
10	0	0	0	0	48	0,10	0,16	0,63	1
11	0	0	0	0	45	0,10	0,18	0,54	1
12	0	0	0	1	51	0,26	0,28	0,91	1
13	0	0	0	1	45	0,26	0,35	0,74	1
14	0	0	0	0	42	0,10	0,23	0,43	0
15	0	0	0	0	43	0,10	0,22	0,46	0
16	1	0	0	0	41	0,29	0,63	0,45	0
17	0	0	0	0	41	0,10	0,23	0,43	0
18	0	0	0	0	40	0,10	0,24	0,42	0
19	0	1	0	0	38	0,23	0,23	1,00	1
20	0	0	0	0	37	0,10	0,28	0,36	0
21	0	0	1	0	34	0,08	0,31	0,25	0
22	0	0	0	0	29	0,10	0,34	0,29	0
23	0	0	0	1	29	0,26	0,51	0,50	1
24	0	0	0	0	30	0,10	0,34	0,29	0
25	0	0	0	0	26	0,10	0,35	0,28	0
TOTAL LP									15

Tabla 3: Información relativa a los 25 pacientes con seguimiento incompleto (Grupo 2, $t < 8$ años).

TRADUCCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

A continuación se especifican las traducciones al español del glosario del texto libre incluido en la lista de secuencias:

5

“Sequence listing” significa “lista de secuencias”.

“Version” significa “versión”.

10

“DNA” significa “ADN”.

“Artificial sequence” significa “secuencia artificial”.

15

“Primer specific to amplify” significa “cebador específico para amplificar”.

“Primer specific to amplify the HGH gene” significa “cebador específico para amplificar el gen HGH”.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para predecir si un sujeto infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es lentoprogresor que comprende:

5

i) determinar el perfil genético de variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH presente en genes en una muestra de dicho sujeto y obtener el perfil genético correspondiente; y

10

ii) determinar la probabilidad $P(LP / Z, T > t)$ mediante la ecuación [1]:

$$P(LP / Z, T > t) = \frac{P(LP / Z)}{P(T > t / Z)} \quad [1]$$

15

donde

20

$P(LP / Z, T > t)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i) en función de un tiempo libre de enfermedad T mayor que cierto tiempo t ;

$P(LP / Z)$ representa la probabilidad de lentoprogresión (LP) para el perfil genético determinado en la etapa (i); y

$P(T > t / Z)$ representa la probabilidad de que el tiempo libre de enfermedad (T) sea mayor que cierto tiempo t para el perfil genético determinado en la etapa (i),

25

en donde si dicha probabilidad $P(LP / Z, T > t)$ es mayor que 0,5 entonces el sujeto es clasificado como lentoprogresor, y

en donde dichas variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH son HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942) y CCR5Δ32.

30

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de sangre periférica.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha probabilidad de lentoprogresión (LP) para un perfil genético determinado $[P(LP / Z)]$ se determina mediante regresión logística.

35

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la probabilidad de que el tiempo libre de enfermedad sea mayor que cierto tiempo t para un perfil genético determinado $[P(T > t / Z)]$ se determina mediante análisis de supervivencia con datos censurados.

40

5. Método para seleccionar un sujeto infectado por VIH para una terapia personalizada, que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor de acuerdo al método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento si es clasificado como no lentoprogresor.

45

6. Método para seleccionar una terapia personalizada para un sujeto infectado por VIH en necesidad de tratamiento, que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor de acuerdo al método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se selecciona una terapia personalizada para dicho sujeto si este es clasificado como no lentoprogresor.

50

7. Kit que comprende los reactivos necesarios para genotipar múltiples variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH, en donde dichas variantes génicas humanas asociadas a la evolución de la infección por VIH son HLA B*27, HLA B*5701, HLA C (rs9264942) y CCR5Δ32, y en donde dichos reactivos son los oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 1-10.

55

8. Kit según la reivindicación 7, que además comprende los reactivos necesarios para genotipar una o más variantes génicas adicionales asociadas a una infección viral distinta de VIH.

9. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para predecir si un sujeto infectado por VIH es lentoprogresor.

60

10. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para seleccionar un sujeto infectado por VIH para una terapia individual que comprende determinar si dicho sujeto es lentoprogresor, en el que la clasificación de dicho sujeto como lentoprogresor selecciona a dicho sujeto para dicha terapia individual.

65

ES 2 438 468 A2

<110> Fundación Biomédica del Complejo Hospitalario Universitario
de Vigo
Servizo Galego de Saude (SERGAS)
Universidade de Vigo

<120> MÉTODOS PARA LA PREDICCIÓN DE LA PROGRESIÓN A ENFERMEDAD DE UN
SUJETO INFECTADO CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA
(VIH)

<130> P7756ES00

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA B*27

<400> 1
ctacgtggac gacacgct 18

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA B*27

<400> 2
agtctgtgcc ttggccttgc 20

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA B*5701

<400> 3
gtctcacatc atccaggt 18

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA B*5701

ES 2 438 468 A2

<400> 4
atccttgccg tcgtaggcgg 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA B*5701

<400> 5
atccttgccg tcgtaggcag 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA B*5701

<400> 6
cgcctccac ttgcgctggg 20

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA C (rs9264942)

<400> 7
cacagtcca attccttgat tcag 24

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify HLA C (rs9264942)

<400> 8
ctgtggaagg caggctgaga c 21

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify CCR5delta32

ES 2 438 468 A2

<400> 9
caaaaagaag gtcttcatta cacc 24

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify CCR5delta32

<400> 10
cctgtgcctc ttcttctcat ttcg 24

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify the HGH gene

<400> 11
cagtgccttc ccaaccattc cctta 25

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer specific to amplify the HGH gene

<400> 12
atccactcac ggatttctgt tgtgtttc 28