

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 288**

21 Número de solicitud: 201530910

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**25.06.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**26.01.2017**

71 Solicitantes:

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (100.0%)  
Avda. de Monforte de Lemos, 5  
28029 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**RESINO GARCÍA, Salvador y  
VÁZQUEZ MORÓN, María Sonia**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Kit y método para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un kit o dispositivo diagnóstico, útil para su empleo en ensayos de pirosecuenciación, que opcionalmente comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo un procedimiento de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que comprende al menos un(os) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 y que permita(n) la amplificación de un fragmento de un máximo de 400 pares de bases del RNA del virus de la hepatitis C que incluya la variante natural de resistencia "Q80K", en un procedimiento de RT-PCR con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.

**ES 2 598 288 A2**

**DESCRIPCIÓN****Kit y método para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.****CAMPO DE TÉCNICA**

5 La presente invención está inserta en el campo médico, en particular en el campo del diagnóstico médico, más en particular en la detección y cuantificación de las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 Se estima que alrededor de 130 -150 millones de personas sufren hepatitis crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) en el mundo. En la actualidad no existe vacuna y la terapia convencional, formada por interferón pegilado (pegIFNa) y ribavirina (RBV) presenta efectos adversos severos y baja eficacia en la mayoría de las variantes del VHC. La aprobación en el 2011 de telaprevir y boceprevir, primeros fármacos antivirales de acción directa (DAA) dirigidos específicamente frente a la proteasa del genotipo 1 del VHC, ha aumentado considerablemente la tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) tanto en pacientes naïve como pre-tratados. Recientemente, la FDA ha aprobado para uso clínico simeprevir, inhibidor de la proteasa de 20 segunda generación y sofosbuvir, inhibidor de la polimerasa NS5B del VHC los cuales presentan actividad elevada frente a distintos genotipos del VHC y una RVS superior a la observada con telaprevir y boceprevir en pacientes con genotipo 1. A corto plazo se espera la aprobación del inhibidor de la proteasa faldaprevir y el inhibidor de la NS5A daclatasvir.

25 Dada la gran variabilidad en los resultados del tratamiento del VHC, la predicción de RVS puede ayudar a individualizar la terapia y tomar decisiones racionales sobre el inicio del tratamiento antiviral. Por tanto, la identificación de predictores basales que garanticen el éxito del tratamiento es deseable con la finalidad de tomar decisiones adecuadas respecto al tipo de tratamiento que aumenten las posibilidades de curación así como el aplazamiento del 30 tratamiento, cuando las posibilidades de respuesta son mínimas y los efectos secundarios relacionados con los fármacos puedan ser un problema. Diversos factores, tanto del huésped como virales, han sido asociados a una RVS. Entre los factores del huésped destacan la edad, el sexo, el estadio de fibrosis hepática, anomalías metabólicas, la raza y polimorfismos

genéticos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen de IL28B; mientras que los predictores virales de RVS incluyen el genotipo del VHC, el nivel de ARN del VHC en sangre, suero o plasma y la cinética viral temprana. Otro factor a tener en cuenta es la co-infección por VIH, la cual se asocia a menores tasas de respuesta del tratamiento contra el VHC.

5 Uno de los principales problemas que surgen en los nuevos tratamientos con DAA es la presencia de mutaciones que confieren al virus resistencia frente a dichos fármacos. Se trata de cuasiespecies virales del VHC que proporcionan una menor sensibilidad inhibitoria al fármaco, lo que llevaría al fracaso farmacológico y por consiguiente a la no curación del paciente. De especial relevancia es el hecho de que dichas mutaciones se han observado incluso en  
10 pacientes naïve de manera natural. En particular, en el caso de simeprevir, se ha encontrado que la variante natural de resistencia Q80K, la cual es observada en pacientes infectados por VHC1a (virus de la hepatitis C, genotipo 1a ó GT1a) con una frecuencia de alrededor del 23-40%, limita la eficacia de simeprevir de un 84% a un 58% tras 12 semanas de tratamiento. A la  
15 vista de los resultados, se recomendó el cribado de todos los pacientes con infección GT1a con el fin de determinar la presencia de la mutación Q80K antes de iniciar el tratamiento con simeprevir y considerar un tratamiento alternativo en pacientes con virus portadores de dicha mutación.

20 Las técnicas descritas en el estado del arte que podrían, en teoría, ser aplicadas para la determinación de Q80K son la pirosecuenciación (Pyromark Q24), la secuenciación 454 y la técnica de secuenciación Sanger.

La pirosecuenciación (Pyromark Q24) es un método de secuenciación basado en la liberación  
25 de los pirofosfatos (PPi) que tiene lugar durante la síntesis de la cadena complementaria de ADN a partir de dNTPs. Este método requiere de una cadena monocatenaria de ADN biotinilada a la que se unirá el cebador (primer de secuenciación) y obtenida mediante amplificación previa con dos primers, uno de ellos biotinilado. Requiere dNTPs, la polimerasa de ADN, así como tres  
enzimas: sulfurilasa (y el sustrato adenosina 5'- fosfosulfato o APS), luciferasa (y el sustrato  
30 luciferina) y apirasa. El proceso de pirosecuenciación se realiza en tres pasos fundamentales. El primero es la adición de los nucleótidos (dNTPs), teniendo en cuenta la secuencia de referencia que genera el orden adecuado de dispensación de nucleótidos que serán incorporados por la ADN-polimerasa liberando un PPi. Así se irá sintetizando la cadena complementaria. Si el dNTP

que ha sido añadido no es el complementario al que ocupa la posición que toca copiar, éste es degradado por la apirasa antes de que se añada el siguiente dNTP, lo que permite eliminar el exceso de dNTP.

5 En el segundo de los pasos el PPi liberado, por medio de la ATP-sulfurilasa, es convertido a ATP. Finalmente, el ATP generado produce la emisión de radiación medida como URL (unidades de radiación luminosa; la radiación luminosa que nosotros denominamos comúnmente "blanca", es el resultado en realidad, de sumar varias radiaciones de distintas frecuencias o colores) como consecuencia de la oxidación de la luciferina a oxiluciferina  
10 catalizada por la luciferasa. Esto permite obtener picos de señal recogidos en un pirograma y proporciona la secuencia y los porcentajes en las posiciones de estudio. La altura de los picos refleja la cantidad de nucleótidos incorporada, así los picos de mayor altura indicarán la incorporación de un mismo nucleótido varias veces y por tanto que dicho nucleótido se encuentra varias veces repetido de manera consecutiva.

15 Este método requiere el diseño de primers tanto para la amplificación como para la realización de la pirosecuenciación. Una de las limitaciones para conseguir que el método sea adecuado es la restricción a un máximo de 400 pares de bases, preferiblemente 300 pares de bases, en el tamaño del fragmento obtenido en la amplificación que, además, debe incluir la posición diana  
20 de estudio así como el requisito de la mayor proximidad del "primer" o cebador de secuenciación a la posición de estudio. Esto se debe a que si la variabilidad de la zona objeto de amplificación es elevada, el desarrollo metodológico se complica dadas las restricciones del mismo y los posibles cambios en la secuencia de referencia.

25 Por otro lado, la secuenciación Sanger se basa en la utilización de dideoxinucleótidos carentes del grupo hidroxilo del C 3', por lo que la incorporación de uno de estos nucleótidos no permite la elongación de la cadena de DNA puesto que la DNA polimerasa necesita el grupo terminal 3' OH para seguir añadiendo más nucleótidos y el dideoxinucleótido carece del mismo. Este método requiere una cadena molde obtenida mediante una amplificación previa, para lo cual se  
30 pueden diseñar primers localizados en zonas conservadas teniendo en cuenta que no hay una gran restricción en cuanto al tamaño del fragmento ni la localización de los mismos.

Por otro lado permite conocer la secuencia pero cuando se trata de cuasiespecies de virus sólo aporta conocimiento de la secuencia que es mayoritaria, sin ofrecer cuantificación de estas cuasiespecies. Además el cromatograma podría presentar dificultades en cuanto a la lectura si existiesen cuasiespecies en proporciones parecidas y el tiempo de respuesta del laboratorio necesario sería mayor.

Por último en la secuenciación 454 la muestra biológica se carga en una placa de fibra óptica, en forma de panel, posee multitud de pocillos que permite transmitir la luz producida por quimioluminiscencia durante la reacción de secuenciación. En primer lugar se genera una genoteca de ADN genómico con la particularidad del tamaño del ADN entre 500 y 1000 nucleótidos generando una genoteca de partida que se carga en la placa. Cada fragmento es amplificado mediante emPCR o PCR basada en emulsión amplificándose hasta 10 millones de veces lo que facilita la detección de señal.

El fundamento de este método de secuenciación es la pirosecuenciación, sin embargo y a diferencia de la pirosecuenciación con Pyromark Q24, su uso es complejo ya que requiere no sólo instalaciones y aparatos, a día de hoy, poco accesibles de forma rutinaria, sino también personal muy especializado para la interpretación de datos. Esto lleva además en la mayoría de las ocasiones a que el tiempo de respuesta del laboratorio se incremente de forma considerable.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una metodología que permita detectar, con bajo coste y corto tiempo de respuesta, la presencia o ausencia de "Q80K" y cuantificar el porcentaje de cuasiespecies virales que presenten la mutación relacionada con la resistencia frente al fármaco simeprevir u otros fármacos antivirales frente al VHC sensibles a la presencia de Q80K en el VHC. Esto permitiría la obtención de un método útil para la predicción de la mejor alternativa terapéutica antiviral permitiendo así una terapia personalizada.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo diagnóstico que opcionalmente comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo un procedimiento de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que

comprende al menos un(os) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 y que permita(n) la amplificación de un fragmento de un máximo de 400 pares de bases del RNA del virus de la hepatitis C que incluya la variante natural de resistencia "Q80K", en un procedimiento de RT-PCR con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, dicho(s) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1, se seleccionan de la lista que consiste en cualquiera de las siguientes SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, dicho(s) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 se seleccionan de la lista que consiste en cualquiera de las siguientes combinaciones de cebadores:

- a. SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3,
- b. SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6,
- c. SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el kit o dispositivo además comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo un procedimiento de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Preferiblemente, dicho kit además comprende al menos uno o más de los siguientes elementos: buffer de reacción, Mg, NTPs, Retrotranscriptasa y una ADN polimerasa.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, dicho kit comprende adicionalmente un(os) cebador(es) útiles para analizar los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación. Preferiblemente, dichos cebadores se seleccionan de cualquiera de las secuencias SEQ ID NOS 7 y/o 4.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit o dispositivo del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendiesen la mutación Q80K.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del kit del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, para predecir la respuesta completa y/o la respuesta parcial de un sujeto humano al tratamiento con simeprevir u otros fármacos antivirales frente al VHC sensibles a la presencia de Q80K en el VHC, en el que el sujeto está infectado por el virus de la hepatitis C genotipo 1a.

Un cuarto aspecto de la presente invención, establece que el kit del primer aspecto de la presente invención, resulta útil en un método adecuado para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K, subtipo a), y que comprende los siguientes pasos:

1. Obtención de una muestra biológica, preferiblemente sangre, suero o plasma, de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a;
2. Extracción del ARN del VHC a partir de la muestra biológica del paso 1);
3. Amplificación del ADN complementario del ARN extraído del VHC en el paso 2, preferiblemente mediante la realización de un procedimiento de un solo paso de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando el kit descrito en el primer aspecto de la presente invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas;
4. Análisis de los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación, preferiblemente para lo cual se utilizan los primers de secuenciación diseñados de SEQ ID No 4 y/o 7, o cualquiera de sus variantes tal y como se han definido estas a lo largo de la descripción, y preferiblemente la secuencia de referencia para realizar el ensayo de pirosecuenciación, donde dicha secuencia de referencia es la secuencia (Y)GTRGA(3)**MAAG**AYCTYGT (SEQ ID NO: 8) ó la secuencia (Y)GTRGA(3)**MAA**AYCT (SEQ ID NO: 9), donde la secuencia de referencia comprendería Y dependiendo del primer utilizado y donde (3) representa (T) o (C); y
5. Determinación del porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1).

A partir de la determinación del porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1) se puede establecer la respuesta al tratamiento de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C al fármaco simeprevir u otros fármacos antivirales frente al VHC sensibles a la presencia de Q80K en el VHC.

5 Así, en un aspecto adicional (quinto aspecto de la invención), la invención proporciona un procedimiento de predicción de la respuesta completa y/o la respuesta parcial, ya sea esta un respuesta basada en la supervivencia exenta de progresión o en el SVR (respuesta virológica sostenida), de un sujeto humano al tratamiento con simeprevir u otros fármacos antivirales frente al VHC sensibles a la presencia de Q80K en el VHC, en el que el sujeto está infectado  
10 por el virus de la hepatitis C genotipo 1a, y en el que el procedimiento comprende:

1. Obtención de una muestra biológica, preferiblemente sangre, suero o plasma, de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a;
2. Extracción del RNA del VHC a partir de la muestra biológica del paso 1);
3. Amplificación del RNA del VHC, preferiblemente mediante la realización de un  
15 procedimiento de un solo paso de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando el kit descrito en el primer aspecto de la presente invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas;
4. Análisis de los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de  
20 ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación, preferiblemente para lo cual se utilizan los primers de secuenciación diseñados de SEQ ID No 4 y/o 7, o cualquiera de sus variantes tal y como se han definido estas a lo largo de la descripción, y preferiblemente la secuencia de referencia para realizar el ensayo de pirosecuenciación, donde dicha secuencia de referencia es la secuencia  
25 (Y)GTRGA(3)MAAGAYCTYGT (SEQ ID NO: 8) ó la secuencia (Y)GTRGA(3)MAAGAYCT (SEQ ID NO: 9), donde la secuencia de referencia comprendería Y dependiendo del primer utilizado y donde (3) representa (T) o (C); y
5. Determinación del porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1); y

6. El resultado es indicativo de una respuesta completa o parcial de un sujeto humano a simeprevir u otros fármacos antivirales frente al VHC sensibles a la presencia de Q80K en el VHC, si se observa que el porcentaje de cuasiespecies virales VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1) se encuentra disminuido con respecto a un valor de referencia.

Otros aspectos de la presente invención se identifican en la descripción detallada de la presente invención.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Programa de diseño de primers para pirosecuenciación (PyroMark Assay Design 2.0.1.15 ©Copyright 2008 QIAGEN group)

**Figura 2.** Secuencia consenso seleccionada y “primers” seleccionados e introducidos manualmente en el programa de diseño para la pirosecuenciación.

**Figura 3.** Diferentes condiciones iniciales para la puesta a punto de la RT-PCR con el kit de Promega.

**Figura 4.** Resultado de RT-PCR para la amplificación del fragmento de la NS3 que comprende la posición de estudio Q80K. Confirmación de que el fragmento es el buscado mediante secuenciación de Sanger.

**Figura 5.** Comparación de las temperaturas de RT, primers purificados por distintos métodos (HPLC y RP1) y distintas concentraciones de VHC.

**Figura 6.** Comparación del número de ciclos de amplificación.

**Figura 7.** Condiciones para la comparación de los kits de One Step RT-PCR de Promega y QIAGEN. Aclarar que los cebadores utilizados son las SEQ ID No 5 y 6 de la invención.

**Figura 8.** Comparación de diferentes kits para RT-PCR one step: Promega vs QIAGEN.

**Figura 9.** Amplificación de 23 muestras biológicas conteniendo VHC 1a RT-PCR con kit QIAGEN y los “primers” de la invención.

5 **Figura 10.** Resultados obtenidos para pirosecuenciación; segunda posición cambio nucleotídico correspondiente a la posición diana Q80K.

**Figura 11.** Introducción de la secuencia de referencia inicial generada por el programa de diseño PyroMark Assay Design 2.0.1.15 ©Copyright 2008 QIAGEN group en el software PyroMark Q24 versión 2.0.6 ©Copyright 2009 QIAGEN group.

10 **Figura 12.** Introducción de la secuencia de referencia seleccionada finalmente en el software PyroMark Q24 versión 2.0.6 ©Copyright 2009 QIAGEN group. para la realización del ensayo de pirosecuenciación.

15 **Figura 13.** . Introducción de la secuencia de referencia seleccionada de forma opcional en el software PyroMark Q24 versión 2.0.6 ©Copyright 2009 QIAGEN group para la realización del ensayo de pirosecuenciación.

20 **Figura 14.** Parametros seleccionados para el análisis de pirosecuenciación teniendo en cuenta los experimentos realizados y la variabilidad que presentan los virus.

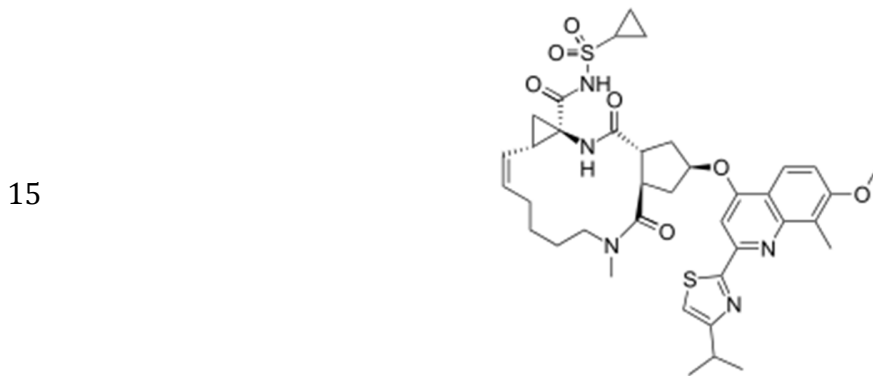
## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

### 25 **DEFINICIONES**

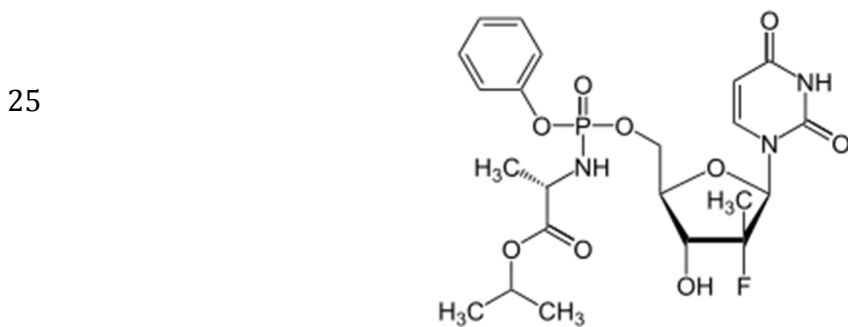
En el contexto de la presente invención, un partidor, **cebador**, iniciador o “**primer**”, es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo  
30 3’hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término “tratamiento” o “tratar” significan la administración de un agente para evitar o eliminar el virus de la hepatitis C o de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. “Tratamiento” incluye también evitar, aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. En el contexto de esta invención, el término “aliviar” se entiende que significa cualquier mejora de la situación del paciente tratado, de manera subjetiva (los sentimiento de o acerca del paciente) y de manera objetiva (los parámetros medidos).

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término simeprevir es un compuesto químico con la siguiente estructura química:

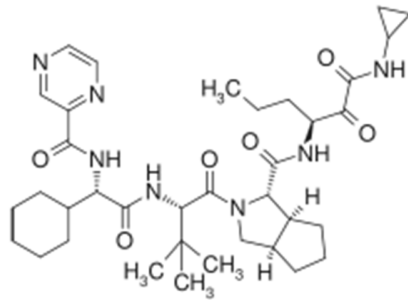


20 En el contexto de esta memoria descriptiva, el término sofosbuvir es un compuesto químico con la siguiente estructura química:



En el contexto de esta memoria descriptiva, el término telaprevir es un compuesto químico con la siguiente estructura química:

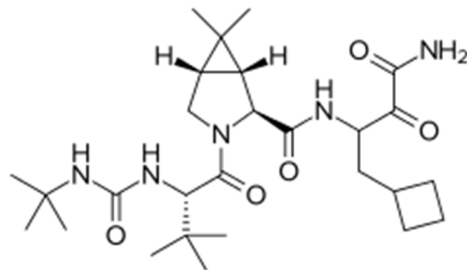
5



10

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término boceprevir es un compuesto químico con la siguiente estructura química:

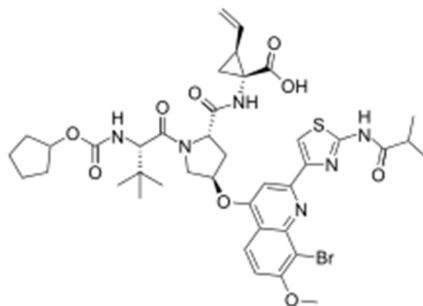
15



20

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término faldaprevir es un compuesto químico con la siguiente estructura química:

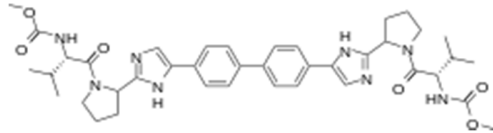
25



30

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término daclatasvir es un compuesto químico con la siguiente estructura química:

5



10 En el contexto de esta memoria descriptiva, el término “mutación Q80K” se refiere a la presencia de los aminoácidos glutamina o lisina en la posición 80 del gen de la NS3 del virus de la hepatitis C.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término “haplotipo único” se refiere a las secuencias de virus que representan a otras que son idénticas a ella.

15 En el contexto de esta memoria descriptiva, el término “amplicón” se refiere al fragmento nucleotídico obtenido mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En el contexto de esta memoria descriptiva, el símbolo “Y” significa y engloba los nucleótidos citosina o timina

20

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

25 Como ya se ha comentado al inicio de la presente invención, una de las principales limitaciones que presenta la pirosecuenciación como técnica que permita determinar la presencia o ausencia de la mutación “Q80K”, es la restricción a un máximo de 400 nucleótidos, preferiblemente a 300 nucleótidos, del tamaño del fragmento obtenido en la amplificación que, además debe incluir la posición diana de estudio, así como el requisito de la mayor proximidad del cebador o “primer” de secuenciación a la posición de estudio. Esto se debe a que si la  
30 variabilidad de la zona objeto de amplificación es elevada el desarrollo metodológico se complica dadas las restricciones del mismo y los posibles cambios en la secuencia de referencia.

Para poder cumplir con estos requisitos resulta pues imprescindible el diseño de “primers” adecuados que permitan la amplificación de un fragmento de un máximo de 400 pares de bases del RNA del virus de la hepatitis C que incluya la variante natural de resistencia “Q80K”. Una vez obtenido este fragmento sería necesario el análisis de dicha secuencia mediante un ensayo de pirosecuenciación (PyroMarkTMQ24, Qiagen) utilizando un “primer” específicamente diseñado para dicha posición diana. Este sistema detectaría cambios en posiciones variables específicas en el ADN que pudieran tener relevancia clínica, y proporcionaría el porcentaje de cuasiespecies del VHC que presenten la mutación Q80K.

10 Con este propósito, para el diseño de los “primers”, los inventores de la presente invención intentaron localizar una secuencia de referencia o consenso para determinar la región diana que tenían que amplificar de la proteína NS3 que incluyese la variante natural de resistencia “Q80K”. En este punto, los inventores se encontraron con un primer obstáculo, en concreto la enorme variabilidad de la secuencia del virus de la hepatitis C. Esto se debe al hecho de que el virus de la hepatitis C se considera una cuasiespecie viral. El origen experimental del concepto de cuasiespecies procedió de los estudios de Weissmann y sus colaboradores con un bacteriófago que infecta algunas estirpes de *Escherichia coli*, denominado fago Q $\beta$ , también desarrollados durante la década de 1970. Con este virus RNA sencillo se realizaron dos observaciones que en años posteriores resultaron de gran relevancia para virus RNA patógenos de organismos diferenciados como el virus de la hepatitis C:

a) Una mutación específica del RNA genómico ocurría con una tasa de  $10^{-4}$  incorporaciones erróneas por nucleótido copiado y ronda de copia.

b) Las poblaciones del fago eran genéticamente heterogéneas en el sentido de que la secuencia de nucleótidos de cada genoma de la población difería de los restantes genomas en una o dos posiciones; de hecho, el genoma más abundante en las poblaciones analizadas representaba tan solo el 15% del total.

Estas dos observaciones establecían que las tasas de error durante la replicación del fago alcanzaban valores que eran unas cien mil veces mayores que los estimados para la replicación de células y virus con ácido desoxiribonucleico (ADN) como material genético y, además, que la poblaciones de fago contenían una distribución de mutantes del mismo tipo que las predichas por el concepto teórico de cuasiespecies. Todos estos datos son extrapolables al virus de la

hepatitis C, que entra dentro del concepto de cuasiespecies lo cual dificulta enormemente obtener una secuencia consenso que abarque la totalidad de la cuasiespecie viral.

5 Teniendo en cuenta esta dificultad y con el objetivo de encontrar unos “primers” que permitieran la determinación de la mutación Q80K, los autores de la presente invención abarcaron todos los virus de VHC genotipo 1 (subtipos a y b) utilizando la totalidad de las secuencias disponibles en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>) asociados a esta secuencia. Una vez obtenidas, se filtraron estas al incluir secuencias de genotipos distintos al 1. Al final de este proceso se seleccionaron un total de 564 secuencias correspondientes a la región NS3 del virus de la hepatitis C genotipo 1 (HCV-1) incluyendo tanto los subtipos a) como b).

10 El siguiente paso fue realizar el alineamiento de las 564 secuencias seleccionadas correspondientes a la región NS3 para determinar la variabilidad de las mismas utilizando los programas Clustal X y Mega 6 (Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882; MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski and Sudhir Kumar. *Mol Biol Evol* (2013) 30 (12): 2725-2729.), llegando a la conclusión finalmente de que los diferentes subtipos subtipo a) y b) no permitían diseñar un único método de pirosecuenciación dada la grandísima variabilidad que se observaba. Para intentar superar este problema, los autores de la presente invención excluyeron las secuencias del subtipo b). La razón para realizar esta sub-selección radica en que sólo el subtipo a) presenta una clara relación con el aumento de fracaso al tratamiento con simeprevir (Palanisamy N, Danielsson A, Kokkula C, Yin H, Bondeson K, Wesslen L, et al. Implications of baseline polymorphisms for potential resistance to NS3 protease inhibitors in Hepatitis C virus genotypes 1a, 2b and 3a. *Antiviral research*. 2013 Jul;99(1):12-7).

25 Con las secuencias que quedaron se realizó una nueva etapa de filtrado para obtener las secuencias correspondientes al genotipo 1 y subtipo a), para posteriormente volver a alinearlas usando los mismos programas que antes. No obstante, en este caso los autores de la presente invención llevaron a cabo un filtrado adicional consistente en seleccionar únicamente aquellas secuencias que constituyesen haplotipos únicos con el objetivo de realizar el mejor diseño de primers para asegurarse de que se amplificaban todas las variantes de la cuasiespecie, para

ello se utilizó el programa DNAsp obteniendo un total de 383 secuencias (Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003 Dec12;19(18):2496-7).

5 No obstante, se siguió observando una gran variabilidad no siendo posible encontrar un fragmento con un máximo de 400 nucleótidos que incluyese la posición diana que se quiere amplificar. Ante este problema los inventores utilizando el programa seqman (DNASTAR Lasergene. SeqMan versión 7.0.0. Copyright©1989-2006) variaron diferentes parámetros con la finalidad de obtener una secuencia consenso con todas las posibles variaciones y buscando un equilibrio entre el número de cambios y lo que implican esas posiciones.

10 Finalmente se obtuvo una secuencia consenso, en concreto la secuencia consenso (SEQ ID No 1) que se ilustra a continuación:

GCGCCCATYACGGCGTAYGCCAGCAGACRAGRGGCCTCYTRGGRTGYATAATYA  
 CCAGCYTRACYGGCCGGGAYAARAACCARGYGGAGGGYGAGGTYCAGATYGTGTC  
 AACYGCYRCCCARACYTTYTTGGCAACVTGCATYAAAYGGGGTRTGCTGGACYGTCT  
 15 ACCAYGGGGCYGGRACRAGGACCATYGCRTCAICYAARGGYCCYGTATCCARATG  
 TAYACCAATGTRGACMARGACCTYGTRGGYTGGCCYGCYCCYCARGGYDCCCGYT  
 CAYTGACACCCTGCACYTGCGGCTCCTCGGACCTYTAYTTGGTCACGAGGCAYGCC  
 GATGTCATYCCCGTGCGCCGGCGRGGTGAYAGCAGGGGCAGCCTGCTYTCGCCYC  
 GGCCYATYTCYTACYTGAARGGCTCCTCGGGGGGYCCRCTGYTGTGCCCCGCGGG  
 20 RCACGCCGTRGGCATATTCAGRGCCGCGGTRTGYACCCGTGGAGTGGCTAARGCR  
 GTGGACTTYATCCCYGTRGAGARCCTAGAGACAACCATGAGR

Dicha secuencia consenso se introdujo en el programa de diseño de ensayos de pirosecuenciación (PyroMark Assay Design 2.0.1.15 ©Copyright 2008 QIAGEN group) (ver figura 1). Una vez realizado el paso de encontrar una secuencia consenso e introducirla en el programa de diseño de ensayos de pirosecuenciación, encontrar los “primers” necesarios para amplificar la secuencia consenso, a priori, constituía un paso sencillo. No obstante, sorprendentemente, el programa no encontró ninguna localización dentro de la secuencia consenso seleccionada (ni siquiera aquellas de una calidad reducida) que permitiese la obtención de los “primers” dado el elevado número de cambios de la secuencia. Los inventores intentaron nuevamente la obtención de los “primers” modificando los parámetros del programa sin éxito. Ante esta situación, los autores de la presente invención, se plantearon intentar la

posibilidad de obtener los “primers” de manera manual utilizando el programa SEQMAN e intentando identificar alguna zona en la secuencia susceptible de emplearse para el diseño de los “primers”. Tras numerosos intentos y utilizando las zonas identificadas, los autores de la presente invención lograron, introduciendo manualmente en el programa de diseño distintas combinaciones de “primers”, identificar una combinación concreta de “primers” (ver figura 2). En este sentido y de acuerdo con el alineamiento obtenido (que tiene igualmente una gran variabilidad), se seleccionaron los siguientes primers o cebadores:

Pyrosequencing Assay Design Analysis Report

-----

10

Assay Name: Assay1Q80K  
 Created by: ISCIII\svazquez  
 Created Date: 15/01/2014 13:54  
 Changed Date: 16/01/2014 11:52  
 Assay Type: Genotyping (SNP)  
 Direction: Forward  
 Description: Q80K

15

Notes:  
 Primer Set 1

20

Primer Set Score: 67  
 Primer Set Quality: Medium  
 Target Polymorphisms: Position47  
 Sequence to Analyze: YGTRGACMARG ACCTYGT (SEQ ID NO 18)

25

Forward PCR Primer

Id: F1  
 Sequence: ACGGCGTAAGCCCAGCAGAC (SEQ ID No 2)  
 Length [nt]: 20  
 Tm, degree C: 66.0  
 %GC: 65.0

30

Biotinylated Reverse PCR Primer

Id: R1

Sequence: AGCCGCACGTGCAGGGTGTCA (SEQ ID No 3)

Length [nt]: 21

5 Tm, degree C: 70.0

%GC: 66.7

Forward Sequencing Primer

Id: S1

10 Sequence: TCCACATGTAAACCAA (SEQ ID No 4)

Length [nt]: 16

Tm, degree C: 46.0

%GC: 37.5

15 No obstante, esta combinación concreta de “primers” presentaba la advertencia de formación de “loop” en el amplicón, aunque con una penalización relativa, además se tuvieron que degenerar algunas posiciones de los “primers” para intentar asegurar la amplificación de todas las posibles variantes del virus observadas en la zona elegida para el diseño.

20 Para llevar a cabo dichas degeneraciones, los autores de las presente invención decidieron realizar un alineamiento de aquellas secuencias del virus de la hepatitis C subtipo 1a, mediante una nueva búsqueda en genbank de VHC1a pero esta vez restringida a virus de humanos obteniendo un total de 57 secuencias para este hospedador. Esto permitió tomar en consideración aquellas posiciones con mayor interés que debían ser degeneradas para asegurar la amplificación de los VHC1a presentes en muestras de procedencia humana. Finalmente se seleccionaron las siguientes degeneraciones teniendo en cuenta el alineamiento  
25 de las 383 secuencias del VHC-1a y el específico para el VHC-1a procedente de humanos:

Forward PCR Primer

Id: F1

Sequence: ACRGCGTAYGCYCAGCARAC (SEQ ID No 5)

30 Biotinylated Reverse PCR Primer

Id: R1

Sequence: AGCCGCARGYGCARGGYGTCA (SEQ ID No 6)

Forward Sequencing Primer

Id: S1

Sequence: TCCARATGTAYACYAA (SEQ ID No 7)

5

Una vez solventada la obtención de los “primers”, los autores de la presente invención se plantearon poner en práctica un método que permitiese la detección específica de la región del genoma del VHC correspondiente al fragmento del gen de la proteína NS3 del virus VHC- genotipo 1, subtipo a) y que permitiese a su vez la detección de la mutación Q80K utilizando los “primers” diseñados. En concreto, este método (de aquí en adelante método de la invención) útil para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendiesen la mutación Q80K, subtipo a), constaba de los siguientes pasos:

10

15

20

25

1. Obtención de una muestra biológica, preferiblemente sangre, suero o plasma, de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a;
2. Extracción del ARN del VHC a partir de la muestra biológica del paso 1);
3. Amplificación del ARN del VHC (en concreto del ADN obtenible a partir del ARN del VHC), preferiblemente mediante la realización de un procedimiento de un solo paso de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando las combinaciones de “primers”, forward y reverse biotinilado de la invención, SEQ ID Nos 5 y 6 y/o opcionalmente 2 y 3;
4. Analizar los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia de ADN correspondiente al fragmento del gen de la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación para el cual se utilizaron los “primers” de secuenciación diseñados SEQ ID No 4 y/o 7;
5. Determinación del porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K.

Se hace notar que la secuencia número 4 admite variantes útiles en la presente invención tal y como la secuencia SEQ ID NO 10 que presenta una T al final de la secuencia número 4: TCCACATGTAAACCAAT. Nos referiremos a estas dos variantes a través de la siguiente

fórmula general: TCCACATGTAAACCAA(1), donde (1) se entiende como la presencia o ausencia del nucleótido (T).

Se hace notar que la secuencia número 7 admite variantes útiles en la presente invención tal y como la secuencia SEQ ID NO 11 que presenta una T al final de la secuencia número 7:  
 5 TCCARATGTAYACYAAT o la SEQ ID NO 12: TCCARATGTAYACCAAT o la SEQ ID NO 13: TCCARATGTAYACCAA. Nos referiremos a estas cuatro variantes a través de la siguiente fórmula general: TCCARATGTAYAC(2)AA(1) (SEQ ID NO 19), donde (1) se entiende como la presencia o ausencia del nucleótido (T) y donde (2) se entiende como (C) o (Y).

10 Para poder proceder a poner en práctica el método de la invención, los autores tomaron como muestras biológicas sangre, suero o plasma que contenía VHC-1a obtenido mediante extracción de ácidos nucleicos con el kit QIAMPViral RNA MINI KIT, obteniendo así RNA del virus HCV-genotipo 1, subtipo a).

Una vez extraídos los ácidos nucleicos, los autores de la presente invención se dispusieron a llevar a cabo un procedimiento de un solo paso de retrotranscripción y amplificación mediante  
 15 reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando el kit de promega One Step RT-PCR constituido por 5X de buffer de reacción, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (10mM), Retrotranscriptasa (AMVRT), Thermoflavus DNA polimerasa, agua libre de nucleasas y la combinación de primers de SEQ ID NOs 5 y 6.

Tal y como se muestra en la figura 4, se confirmó, a través de la utilización de la combinación  
 20 de primers de SEQ ID No 5 y 6, la obtención de una banda del tamaño esperado. Esto se confirmó realizando la secuenciación de dicha banda por el método Sanger con el objetivo de verificar que el amplicón se correspondía con la región del genoma del VHC correspondiente al fragmento del gen de la proteína NS3 del virus HCV-genotipo 1, subtipo a), de 292 nucleótidos que comprende la región de la mutación Q80K. De esta manera se confirmó positivamente el  
 25 funcionamiento de la combinación de "primers" de SEQ ID No 5 y 6 para obtener el fragmento deseado que contiene la posición diana objeto de estudio y que posteriormente serviría para cuantificar las cuasiespecies virales presentes en la muestra.

Con el fin de optimizar este paso de amplificación del método de la invención, los autores llevaron a cabo múltiples combinaciones, en concreto la utilización de distintas concentraciones

de los “primers” de la invención, de nucleótidos así como de gradientes de temperaturas. Las condiciones de mezcla se detallan en la figura 3.

5 Sin embargo, uno de los principales problemas con el que se encontraron los autores de la invención a la hora de optimizar este proceso de amplificación de muestras, radica en la falta de obtención de una cantidad suficiente de amplicones que permita llevar a cabo el proceso de pirosecuenciación del método de la invención. Con el propósito de solventar este problema, los autores de la presente invención probaron distintas temperaturas de retrotranscripción (en concreto temperaturas de 48 y 45°C), distintas diluciones del extracto y compararon en paralelo la utilización de los primers purificados por HPLC y RP1 tal y como se muestra en la figura 5.

10 El ensayo se realizó utilizando extractos obtenidos mediante la extracción de VHC-1a a partir de sangre, suero o plasma y se realizaron además diluciones 1:10 y 1:100 con el objetivo de ver la sensibilidad de la técnica con las nuevas condiciones de RT y teniendo en cuenta la purificación de los “primers”. El resto de las condiciones se fijaron según el ensayo previo. Se obtuvo una buena banda de amplificación de 292 pares de bases para el extracto puro (directamente  
15 obtenido desde sangre, suero o plasma) y para la dilución 1:10 con ambas temperaturas, pero con mejores resultados para la RT de 48°C y los “primers” purificados por HPLC.

A continuación los autores de la presente invención amplificaron siete muestras disponibles de pacientes HCV genotipo 1, subtipo a) variando el número de ciclos así como la concentración de los “primers” elegidos con respecto a un aumento del número de ciclos. Los resultados se  
20 ilustran en la figura 6. Tal y como se puede percibir en esta figura, aumentando a 40 ciclos la reacción se obtiene mejor banda, pero también se observaron bandas tenues en 5 muestras e incluso ausencia en una de las muestras lo que planteaba un problema en cuanto a la necesidad de obtener suficiente amplicón para la pirosecuenciación

Para solventar este problema, los autores decidieron comparar dos Kits (Promega y Qiagen)  
25 teniendo en cuenta la temperatura de “annealing” (anillamiento) seleccionada en la puesta a punto con el Kit de promega y las condiciones para ambos que se especifican en la figura 7. En la figura 8 se ilustra la comparativa entre la realización del método de amplificación de la invención utilizando el kit de promega y el kit de qiagen.

Tal y como se ilustra en la figura 8, se percibe que aunque ambos kits permiten la amplificación  
30 del fragmento, el kit de qiagen mejora sustancialmente la obtención de bandas. En base a estos

resultados, los autores de la presente invención, confirmaron los resultados utilizando 23 nuevas muestras clínicas para realizar la extracción y la amplificación con las condiciones y el kit seleccionado. Los resultados se ilustran en la figura 9-. Las condiciones seleccionadas se detallan en la tabla abajo

5 Tabla A1. (Los primers indicados son los cebadores SEQ ID No 5 y 6 de la invención).

	Mezcla	( $\mu$ l) 1x	PROGRAMA Q80K	
H <sub>2</sub> O		9	T <sup>a</sup>	tiempo
5x Buffer		10	50	30'
dNTPs	400 $\mu$ M	2	95	15'
HCVPQ80K_F	0.6 $\mu$ M	6	40 CICLOS:	
HCVPQ80K_R-b	0.6 $\mu$ M	6	94	1'
Enzima MIX		2	58	1'
Solución Q		10	72	1'
suma		45	EXTENSION:	
			72	10'

Tras la selección de estas condiciones, solo quedaba introducir las condiciones del método de pirosecuenciación en el software PyroMark Q24 versión 2.0.6 ©Copyright 2009 QIAGEN group.

10 El primero de los problemas que se encontraron los inventores fue en relación a la secuencia propuesta por el programa de diseño (Sequence to Analyze: GTRGACMARGACCTYGT) tal y como se muestra en la figura 10. Esta secuencia no podía ser analizada por el programa dado que existían en la posición a estudio sitios variables con dispensación común "Sequence to Analyze: GTRGACMARGACCTYGT" (SEQ ID NO 20). Los inventores entonces decidieron

15 revisar el triplete responsable del cambio aminoacídico Q80 K observando sobre los alineamientos previos que la posición que más peso tenía para el cambio era la primera, optando entonces por mantener el cambio en esta y fijar en la última una A ya que se daba con mayor frecuencia teniendo en cuenta los alineamientos. Por otro lado, el cambio a G de esta

20 tercera posición podría ser valorado tras el análisis ya que el siguiente nucleótido también se trataba de G. Por tanto, la secuencia consenso final para el análisis de pirosecuenciación fue "Sequence to Analyze: GTRGACMAAGACCTYGT" (SEQ ID NO 16 correspondiente a una especificación particular de la secuencia general SEQ ID NO 8) generando un orden de dispensación de nucleótidos aceptado por el programa, tal y cómo se muestra en la figura 11.

25 No obstante y teniendo en cuenta la gran variabilidad del fragmento otra de las secuencias factibles para el análisis sería: "Sequence to Analyze:GTRGACMAAGAYCT" (SEQ ID NO 17

correspondiente a una especificación particular de la secuencia general SEQ ID NO 9) tal y como se muestra en la figura 12. Por otro lado se ajustaron los parámetros del análisis tal y como se muestra en la figura 13. De esta forma se logró proporcionar un método que provee de información sobre el porcentaje de cambio nucleotídico de la posición diana (Q80K).

- 5 Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo un procedimiento de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que comprende al menos un(os) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 y que permita(n) la amplificación de un fragmento de un máximo de 400 pares de bases del RNA del virus de la hepatitis C que  
10 incluya los 292 pares de bases correspondientes a la posición 10-301 de la NS3 y, por tanto, que incluya la variante natural de resistencia "Q80K", en un procedimiento de RT-PCR con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K. Preferiblemente, la ampliación se realiza mediante un procedimiento, más preferiblemente de un solo paso, de retrotranscripción y  
15 amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR),

Siempre que se refiera a la hibridación del (de los) cebador(es), se prefiere que dicho(s) cebador(es) sea(n) capaz(ces) de hacerlo en condiciones rigurosas. El rigor es un término usado en los experimentos de hibridación. El rigor refleja el grado de complementariedad entre el cebador y el ácido nucleico, el de mayor rigor, el mayor porcentaje de complementariedad  
20 entre el cebador y el ácido nucleico que se une al filtro. La persona experta sabe bien que la temperatura y las concentraciones salinas tienen un efecto directo en los resultados que se obtienen. Se reconoce que los resultados de la hibridación están relacionados con el número de grados por debajo de la  $T_f$  (temperatura de fusión) del ADN a la cual el experimento se lleva a cabo.

- 25 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, dicho(s) cebador(es) (primer(s)) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 se definen por las siguientes SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Se proporcionan sus detalles en la Tabla A2.

**Tabla A2: Secuencias de oligonucleótidos (primers)**

<b>Secuencia del oligonucleótido</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Para la hibridación con la SEQ ID NO:</b>	<b>pbs</b>
ACGGCGTAAGCCCAGCAGAC	2	1	20 pbs
AGCCGCACGTGCAGGGTGTCA	3	1	21 pbs
ACRGCCTAYGCYCAGCARAC	5	1	20 pbs
AGCCGCARGYGCCARGGYGTCA	6	1	21 pbs

Otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, proporciona un kit que comprende al menos un(os) cebador(es) (primer(s)) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 y que permita(n) la amplificación de un fragmento de un máximo de 400 pares de bases del RNA del virus de la hepatitis C que incluya los 292 pares de bases correspondientes a la posición 10-301 de la NS3 y, por tanto, que incluya la variante natural de resistencia "Q80K", con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K, donde dichos cebadores (primers) se seleccionan de la lista que consiste en cualquiera de las siguientes combinaciones: SEQ ID Nos 2 y 3 ó 5 y 6 ó 2, 3, 5 y 6.

En realizaciones particulares, el kit es un kit adecuado para la PCR que comprende adicionalmente a un(os) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 y amplificarla con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K, los reactivos necesarios para llevar a cabo dicho procedimiento PCR. Preferiblemente, el kit comprende al menos uno o más de los siguientes elementos: buffer de reacción, Mg, dNTPs, Retrotranscriptasa y una ADN polimerasa, preferiblemente y al menos un(os) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 y amplificarla con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K. Más preferiblemente, el kit comprende al menos uno o más de los siguientes elementos: buffer de reacción, Mg, dNTPs, Retrotranscriptasas, una ADN polimerasa y los cebadores de SEQ ID Nos 2 y 3 ó 5 y 6 ó 2, 3, 5 y 6. Aún más preferiblemente el kit comprende buffer de reacción 5X

(Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl, DTT) Solución Q , dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (10mM), Retrotranscriptasas (Onmniscript y Sensiscript Reverse Transcriptasa) ADN polimerasa (HotStar taq DNA polimerasa), agua libre de nucleasas así como los cebadores de SEQ ID Nos 2 y 3 ó 5 y 6 ó 2, 3, 5 y 6.

- 5 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el kit comprende adicionalmente un(os) cebador(es) útiles para analizar los amplicones obtenidos correspondientes al fragmento de la secuencia del gen de la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación. En particular, dichos cebadores se seleccionan de cualquiera de las secuencias SEQ ID NOS 4 y/o 7 o cualquiera de sus variantes tal y como se han definido estas a lo largo de la descripción. La selección de dichas secuencias, por supuesto, depende de los tipos de “primers” utilizados en el proceso de amplificación.

El uso del kit del primer aspecto de la presente invención, no está particularmente limitado, aunque se prefiere su uso en el procedimiento de la invención o en cualquiera de sus realizaciones.

- 15 Así en un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendiesen la mutación Q80K.)

- 20 Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del kit del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, para predecir la respuesta completa y/o la respuesta parcial de un sujeto humano al tratamiento con simeprevir u otros fármacos antivirales frente al VHC sensibles a la presencia de Q80K en el VHC, en el que el sujeto está infectado por el virus de la hepatitis C genotipo 1a.

- 25 Un cuarto aspecto de la presente invención, establece que el kit del primer aspecto de la presente invención, resulta útil en un método adecuado para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K, subtipo a), que consta de los siguientes pasos:

1. Obtención de una muestra biológica, preferiblemente sangre, suero o plasma, de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a;

2. Extracción del ARN del VHC a partir de la muestra biológica del paso 1);
3. Amplificación del ARN del VHC, preferiblemente mediante la realización de un procedimiento de un solo paso de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando el kit descrito en el primer aspecto de la presente invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas o utilizando los “primers” de SEQ ID NO: 5 y 6 y/o los “primers” de SEQ ID NO 2 y 3 o utilizando “pimers” capaces de amplificar total o parcialmente la SEQ ID NO 1;
4. Análisis de los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente al fragmento de la secuencia del gen correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación, preferiblemente para lo cual se utilizan los primers de secuenciación diseñados de SEQ ID No 4 y/o 7, o cualquiera de sus variantes tal y como se han definido estas a lo largo de la descripción, y preferiblemente la secuencia de referencia para realizar el ensayo de pirosecuenciación, donde dicha secuencia de referencia es la secuencia (Y)GTRGA(3)**MAAGAYCTYGT** (SEQ ID NO: 8) ó la secuencia (Y)GTRGA(3)**MAAGAYCT** (SEQ ID NO: 9), donde la secuencia de referencia comprendería Y dependiendo del primer utilizado y donde (3) representa (T) o (C); y
5. Determinación del porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1).

20 A partir de la determinación del porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1) se puede establecer la respuesta al tratamiento de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C al fármaco simeprevir u otros fármacos antivirales frente al VHC sensibles a la presencia de Q80K en el VHC.

25 La “Respuesta” se basa en el resultado clínico, concretamente en la “supervivencia exenta de progresión” (PFS). La supervivencia exenta de progresión (PFS) es el plazo de tiempo durante y después de la medicación o tratamiento durante el cual, la etiología causada por el VHC-1a que se está tratando administrando el fármaco simeprevir no empeora. El tema decisivo en esta realización es si el individuo que padece la hepatitis C muestra una disminución en la carga viral en un momento dado. Más concretamente la “Respuesta” se basa en el “SVR” (respuesta virológica sostenida del inglés “sustained virological response”) que se define como niveles de

30

ARN del virus de la VHC indetectables en sangre tras 12, o 24, semanas una vez finalizado el tratamiento.

Así, en un aspecto adicional (quinto aspecto de la invención), la invención proporciona un procedimiento de predicción de la respuesta completa y/o la respuesta parcial, ya sea esta un  
5 respuesta basada en la supervivencia exenta de progresión o en el SVR, de un sujeto humano al tratamiento con simeprevir, en el que el sujeto está infectado por el virus de la hepatitis C genotipo 1a, y en el que el procedimiento comprende:

1. Obtención de una muestra biológica, preferiblemente sangre, suero o plasma, de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a;
- 10 2. Extracción del ARN del VHC a partir de la muestra biológica del paso 1);
3. Amplificación del ARN del VHC, preferiblemente mediante la realización de un procedimiento de un solo paso de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando el kit descrito en el primer aspecto de la presente invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas o utilizando los  
15 "primers" de SEQ ID NO: 5 y 6 y/o los "primers" de SEQ ID NO 2 y 3 o utilizando "pimers" capaces de amplificar total o parcialmente la SEQ ID NO 1;
4. Análisis de los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente al fragmento de la secuencia del gen correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación, preferiblemente para lo cual se utilizan  
20 los primers de secuenciación diseñados de SEQ ID No 4 y/o 7, o cualquiera de sus variantes tal y como se han definido estas a lo largo de la descripción, y preferiblemente la secuencia de referencia para realizar el ensayo de pirosecuenciación, donde dicha secuencia de referencia es la secuencia (Y)GTRGA(3)**MAAGAYCTYGT** (SEQ ID NO: 8) ó la secuencia (Y)GTRGA(3)**MAA**GAYCT (SEQ ID NO: 9), donde la secuencia de  
25 referencia comprendería Y dependiendo del primer utilizado y donde (3) representa (T) o (C); y
5. Determinación del porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1); y

6. en el que el resultado es indicador de la respuesta completa o la respuesta parcial de un sujeto humano a simeprevir si se observa que el porcentaje de cuasiespecies virales VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso 1) se encuentra disminuido con respecto a un valor de referencia.

5 Dicho valor de referencia representa el porcentaje de cuasiespecies virales VHC que presentan la mutación Q80K en una muestra biológica a partir del cual se determina que el tratamiento con simeprevir no produce respuesta completa o al menos una respuesta parcial clínicamente eficaz.

Se hace notar que el aislamiento de la muestra del sujeto vivo como tal no es también una parte de la invención. La cirugía de un cuerpo humano vivo como tal no es también una parte de la invención. Lo que es una parte de la invención es el procedimiento *in vitro* para predecir la respuesta completa y/o la respuesta parcial, ya sea esta un respuesta basada en la supervivencia global o en la supervivencia exenta de progresión, de un sujeto humano al tratamiento con simeprevir así como el procedimiento *in vitro* para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K, subtipo a). De esta manera, el procedimiento para predecir una respuesta de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un procedimiento *in vitro*.

Los procedimientos de la presente invención se pueden aplicar con muestras de individuos de cualquier sexo, es decir, hombre o mujer, y de cualquier edad.

20 En un sexto aspecto, la invención proporciona también un procedimiento para clasificar un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C en uno de dos grupos. A no ser que se especifique de manera implícita o explícita de otra forma, los detalles de la invención tal como se ha detallado anteriormente se aplican también al tercer aspecto de la invención. El grupo 1 comprende los sujetos identificables mediante el procedimiento para predecir la respuesta completa y/o la respuesta parcial, ya sea esta una respuesta basada en la supervivencia global o en la supervivencia exenta de progresión, de un sujeto humano al tratamiento con simeprevir, tal como se ha detallado anteriormente que muestran una cualquiera o más de: respuesta, respuesta parcial, respuesta completa; y en el que el grupo 2 representa el resto de sujetos. Es posible proporcionar una terapia personalizada a un individuo, dependiendo de si el individuo está clasificado en el grupo 1 o el grupo 2. Esto se lleva a cabo normalmente como sigue: (a) se extrae una muestra biológica, preferiblemente sangre, suero o plasma, a pacientes que están

infectados con el virus de la hepatitis C, (b) a partir de dicha muestra, se procede a la clasificación en el grupo 1 o el grupo 2. Basándose en la clasificación en el grupo 1 o el grupo 2, se puede seleccionar una terapia personalizada que puede ser particularmente beneficiosa para el paciente.

5 Los presentes inventores han identificado de esta manera un subgrupo novedoso de pacientes que se beneficiarían de la terapia con simeprevir. De esta manera, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende simeprevir, para tratar un sujeto humano del grupo 1. Dada la predicción positiva, la invención proporciona de esta manera un procedimiento de selección de pacientes (grupo 1) que puede ser particularmente  
10 beneficioso para la administración de dicha terapia. Además, puede no justificarse en sujetos pacientes del grupo 1 la potencial toxicidad de un tratamiento alternativo.

Además, la invención proporciona una composición farmacéutica para tratar un sujeto humano del grupo 2 identificable mediante el procedimiento del tercer aspecto de la invención, en el que dicha composición se selecciona de la lista que consiste en sofosbuvir, telaprevir, boceprevir,  
15 faldaprevir y daclatasvir.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO1 y al uso de dicha secuencia para identificar al menos un(os) cebador(es) capaz(ces) de hibridarse con la SEQ ID NO: 1 y amplificarla con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.

20 Un octavo aspecto de la invención se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende, consiste o consiste esencialmente en cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o su variante, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o sus variantes, o cualquier combinación de las mismas.

Una realización preferida del octavo aspecto de la invención se refiere a una composición que  
25 comprende al menos una secuencia polinucleotídica que comprende, consiste o consiste esencialmente en cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 o cualquier combinación de las mismas.

Otra realización preferida del octavo aspecto de la invención se refiere a una composición que  
30 comprende las siguientes secuencias polinucleotídicas que comprenden, consisten o consisten

esencialmente en cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y opcionalmente la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y opcionalmente la SEQ ID NO: 7.

5 En otra realización preferida del octavo aspecto de la invención los secuencias polinucleotídicas o “primers” son capaces de dar lugar a amplicones, con un tamaño máximo de 400 nucleótidos, susceptibles de ser secuenciados o analizados por pirosecuenciación con el objetivo de detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.

10 Un noveno aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica que comprende, consiste en o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 1.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1. Material y métodos de la pirosecuenciación Q80K**

Se realizó la extracción de RNA viral a partir de 200µl de plasma de un total de 30 muestras de pacientes infectados por VHC-1a mediante el Kit QIAMPViral RNA MINI KIT (QIAGEN) obteniendo un volumen final de extracto de 50 µl. Tras la extracción se procedió a la  
15 ampliación del fragmento de la NS3 que contenía la posición diana Q80K a partir de 5µl del extracto. Para ello, se realizó una RT-PCR con el kit One Step RT-PCR QIAGEN, la mezcla contenía 10µl de 5X Buffer, 2µl de dNTPs 10mM, 10µl de Q-solution, 2µl de Enzima mix, 9µl de agua libre de nucleasas y los primers HCPQ80K\_F (5' ACRGCGTAYGCYCAGCARAC 3') (SEQ  
20 ID NO 5) y HCVPQ80K\_R-b (5' AGCCGCARGYGCARGGYGTCA 3') (SEQ ID NO 6) a una concentración de 0.6µM en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de termociclado fueron 50°C durante 30 minutos para la retrotranscripción, seguido de 95°C para la activación de la polimerasa DNA HotStarTaq y desnaturalización seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 minuto a 58°C , 1 minuto a 72°C y con una extensión final de 10 minutos a 72°C en termociclador  
25 GeneAmp PCR System 9700. Una vez realizada la amplificación se visualizaron las bandas en un gel de agarosa al 1%.

Posteriormente se procedió a realizar la pirosecuenciación a partir del producto obtenido mediante esta RT-PCR. Para ello, se diseñó en el software PyroMark Q24 versión 2.0.6 ©Copyright 2009 QIAGEN group un tipo de ensayo AQ Assay con la secuencia de referencia  
30 GTRGACMAAGACCTYGT (SEQ ID NO 16 correspondiente a una especificación particular de

la secuencia general SEQ ID NO 8) seleccionada y ajustando los parámetros para el análisis mostrados en el figura 13. De esta manera se obtuvo el archivo “pyrosetup” que definía las condiciones del ensayo. Posteriormente se generó la plantilla de análisis que contenía las muestras a analizar, máximo 24 contando con un pocillo reservado para el oligo control que permitiera controlar el proceso de pirosecuenciación. Para la realización del ensayo se encendió el equipo 30 minutos antes de la realización del mismo (por recomendación del fabricante). Se rellenó el cartucho con los volúmenes que se requerían de Enzima, Sustrato y las cuatros bases, suministrados en el kit PyroMark Gold Q24 Reagents (QIAGEN), e indicados por el report que ofrece el software “pre run information” y que se origina tras la cumplimentación de la plantilla teniendo en cuenta el número de muestras a analizar para cada ensayo. Se introdujo el cartucho en el pirosecuenciador y se procedió a la inmovilización del producto de RT-PCR. Con este fin se realizó una mezcla de 2 µl de sefarosa (Streptavidin-sepharose Hig performance, GE Healthcare) , 40 µl de Pyromark binding buffer (QIAGEN) y 18 µl de agua mili Q por cada 20 µl producto de RT-PCR a analizar, es decir, por muestra. Para el oligo control se realizó una mezcla de 2 µl de sefarosa (Streptavidin-sepharose Hig performance, GE Healthcare), 40 µl de Pyromark binding buffer (QIAGEN) y 13 µl de agua mili Q. Una vez mezclados con el producto de RT-PCR se agitaron de manera constante durante 10 min a 1.400 rpm. Una vez puesto en agitación se procedió a la preparación de la placa para pirosecuenciación que contenía por pocillo 24,25µl de PyroMark Annealing Buffer (QIAGEN) y 0.75 µl del primer de secuenciación diseñado HCVPQ80K\_SEQ 5'TCCARATGTAYACCAAT 3' (SEQ ID NO 12) de concentración 10µM. Para el pocillo del oligo control se añadió directamente 25µl de PyroMark Annealing Buffer (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se rellenó cada bandeja con el volumen adecuado, siguiendo también las indicaciones del fabricante, de etanol al 70%, PyroMark Wash Buffer (QIAGEN), PyroMark Denaturation Solution (QIAGEN) y agua Milli Q. Transcurrido el tiempo de agitación y sin que pasara más de un minuto, puesto que las bolitas de sefarosa se depositan con gran facilidad, se colocó la placa con la mezcla que contiene el producto de RT-PCR en la estación del pirosecuenciador. Se procedió entonces a la captura de las cadenas de DNA biotiniladas. Estas cadenas servirían de molde para la pirosecuenciación. Teniendo cuidado con el sentido del peine con los filtros, se capturó el producto de la PCR unido a las bolas de sefarosa que estaban agitándose hasta ese momento, durante unos 15 segundos, comprobando que el filtro había absorbido toda la

muestra. Una vez capturadas se introdujo el peine en la bandeja que contenía el etanol durante 5 segundos, observando también como pasaba el líquido a través del tubo. Después se pasó el peine durante 5 ó 10 segundos por la solución de desnaturalización, PyroMark Denaturation Solution (QIAGEN) y seguidamente 10 segundos por el buffer de lavado PyroMark Wash Buffer (QIAGEN). Tras realizar estos pasos se colocó el peine en vertical y se observó el paso del líquido durante unos segundos. Como el ADN de cadena sencilla marcado con la biotina y unido con la sefarosa se queda retenido en los filtros en este paso es importantísimo en este punto APAGAR LA BOMBA DE VACIO con el botón y además poner el peine en posición off. El siguiente paso es la liberación de la muestra retenida en el filtro sobre la placa que contiene la mezcla del primer de secuenciación y el buffer de annealing. Para ello se agita el peine sobre la misma para dejar caer el producto retenido en los pocillos correspondientes. Una vez realizado esto se pasa el peine por la bandeja que contiene agua durante 10 segundos todavía con el peine en posición off, y después, se enciende la bomba y con el peine en la posición on se lava en la otra bandeja que contiene agua colocando el peine en vertical una vez realizado este paso.

La placa que contiene ahora la mezcla de la cadena biotinilada, el primer de secuenciación y el buffer de annealing se lleva a una plancha suministrada por PyroMark que previamente se ha calentado a 80° C y mantenida a esta temperatura donde se colocará la placa de pirosecuenciación durante 2 minutos para que se produzca la hibridación. Una vez transcurrido este tiempo se deja enfriar durante unos 10 minutos antes de poner la placa en el pirosecuenciador.

Para comenzar el run se inserta el USB que contiene el ensayo diseñado, el archivo "pyrorun", se selecciona y el equipo comienza el análisis tras el equilibrado de presión, temperatura del bloque y la presión del líquido refrigerante. Cuando el equipo finaliza confirma que ha terminado el proceso y que ha guardado los datos de análisis en el USB. Este archivo deber ser analizado entonces en el software PyroMark Q24 versión 2.0.6 ©Copyright 2009 QIAGEN group.

### **Ejemplo 2. RESULTADOS PIROSECUENCIACIÓN Q80K**

Los resultados obtenidos son analizados en el software PyroMark Q24 versión 2.0.6 ©Copyright 2009 QIAGEN group. Estos resultados ofrecen información sobre el porcentaje de cambio nucleotídico de la posición diana (Q80K), indicándonos la proporción de cuasiespecies que

contienen los diferentes aminoácidos. Tal y como se observa en la Figura 10, la posición diana Q80K, que viene dada por la posición 2, nos ofrece un 100% de C y un 0% de A en esa posición, indicando que el 100% de las cuasiespecies virales no presentan el aminoácido K y por tanto la ausencia de polimorfismo Q80K.

5

**Reivindicaciones**

- 5 1. Un kit adecuado para llevar a cabo un procedimiento de retrotranscripción y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que comprende al menos unos cebadores seleccionados de la lista que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias capaces de hibridarse con la SEQ ID NO 1 permitiendo la amplificación de un fragmento de un máximo de 400 pares de bases del RNA del virus de la hepatitis C que incluya la variante natural de resistencia "Q80K", mediante un procedimiento RT-PCR, SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 10 2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho kit además comprende al menos uno o más de los siguientes elementos: buffer de reacción, Mg, dNTPs, Retrotranscriptasa y una ADN polimerasa.
- 15 3. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho kit además comprende los siguientes elementos: buffer de reacción 5X (Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl, DTT) Solución Q, dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (10mM), Retrotranscriptasas, ADN polimerasa y opcionalmente agua libre de nucleasas.
- 20 4. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho kit comprende adicionalmente un(os) cebador(es) útiles para analizar los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación, donde dichos cebadores se seleccionan de cualquiera de las secuencias: SEQ ID NO: 4, 7, 11, 12 y 13.
- 25 5. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 4, para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendiesen la mutación Q80K.
6. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 4, para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendiesen la

mutación Q80K, donde la secuencia de referencia para realizar el ensayo de pirosecuenciación es la secuencia (SEQ ID NO: 8) ó la secuencia (SEQ ID NO: 9).

- 5 7. Un procedimiento para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendiesen la mutación Q80K, y que comprende los siguientes pasos:
- 10 a. Extracción del ARN del VHC a partir de una muestra biológica aislada, preferiblemente sangre, suero o plasma, de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a;
  - b. Amplificación del ARN del VHC mediante la utilización del kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
  - 15 c. Analizar los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación de acuerdo al uso descrito en la reivindicación 4; y
  - d. Determinar el porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en base al análisis del paso c).
- 20 8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde el análisis de los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación, se realiza utilizando los cebadores tal y como se han definido estos en la reivindicación 4.
- 25 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8, donde la secuencia de referencia para realizar el ensayo de pirosecuenciación es la secuencia (SEQ ID NO: 8) ó la secuencia (SEQ ID NO: 9).
10. Un procedimiento de predicción de la respuesta completa y/o la respuesta parcial de un sujeto humano al tratamiento con simeprevir, en el que el sujeto está infectado por el virus de la hepatitis C genotipo 1a, y en el que el procedimiento comprende:

- 5
- a. Extracción del ARN del VHC a partir de una muestra biológica aislada, preferiblemente sangre, suero o plasma, de un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a;
  - b. Amplificación del ARN del VHC mediante la utilización del kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
  - c. Analizar los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación de acuerdo al uso descrito en la reivindicación 4;
  - d. Determinar el porcentaje de cuasiespecies del VHC que presentan la mutación Q80K en base al análisis del paso c); y
  - e. en el que el resultado es indicador de la respuesta completa o la respuesta parcial de un sujeto humano a simeprevir si se observa que el porcentaje de cuasiespecies virales VHC que presentan la mutación Q80K en la muestra biológica del paso a) se encuentra disminuido con respecto a un valor de referencia.
- 10
- 15
- 20
- 25
11. El procedimiento según la reivindicación 10, donde el análisis de los amplicones obtenidos correspondientes a la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la proteína NS3 mediante un ensayo de pirosecuenciación, se realiza utilizando los cebadores tal y como se definen estos en la reivindicación 4.
  12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, donde la secuencia de referencia para realizar el ensayo de pirosecuenciación es la secuencia (SEQ ID NO: 8) ó la secuencia (SEQ ID NO: 9).
  13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la respuesta se refiere a la supervivencia exenta de progresión o al SVR (respuesta virológica sostenida).
  14. Un procedimiento para clasificar un sujeto humano infectado por el virus de la hepatitis C, genotipo 1a, en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los sujetos

identificables mediante el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 10-13, y en el que el grupo 2 representa el resto de sujetos.

15. Un polinucleótido que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO 1-13.

PyroMark Assay Design - [Assay1Q80K - copia2 - Q80K (SNP)]

File Edit Assay Windows Help

Assay Type: Genotyping (SNP)  
Description: Q80K

Sequence Editor | Graphic View | Final Primer Set

```

1 GCGCCATCA CCGCGTACGC CCAGCAGACA AGAGGCTCC TAGGATGCAT AATCACCAGC
61 CTAACCGGCC GGGACAAAA CCAAGCGGAG GGCAGGTCC AGATCGTGTC AACCGCCACC
121 CAAACCTTCC TGGCAACATG CATCAACGGG GTATGCTGGA CCGTCTACCA CGGGGCCGGA
181 ACAAGGACCA TGCATCACC CAAAGGCCCC GTCATCCAAA TGTACACCAA TGTAGACCAA
241 GACCTEAGTAG GCTGGCCCGC CCCCAAGGCC ACCCGTCAC TGACACCTTG CACCTGCGGC
301 TCCTCGGACC TCTACTGGT CACGAGGCAC GCCGATGTCA TCCCGTGCG CCGCGAGGT
361 GACAGCAGGG GCAGCCTGCT CTCGCCCGG CCCATCTCCT ACCTGAAAGG CTCTCGGGG
421 GGCCCACTGC TGTGCCCGC GGGACACGCC GTAGGCATAT TCAGAGCCCG GGTATGCACC
481 CGTGGAGTGG CTAAGCAGT GGACTTCATC CCCGTAGAGA ACCTAGAGAC AACCATGAGA
    
```

Primer Set

Unique Seq. Primers  Primer Set Score

Variable Positions

Name: Q80K  
Position: 238 Type: SNP/Point Mutation  
Variation: M  
Alleles: 2. C

47 of 89

Fig. 1

The screenshot displays the PyroMark Assay Design software interface. The main window title is "PyroMark Assay Design - [Assay1Q80K - copia2 - Position47 (SNP)]". The interface includes a menu bar (File, Edit, Assay, Windows, Help) and a toolbar with icons for file operations and a play button. The "Assay Type" is set to "Genotyping (SNP)" and the "Description" is "Q80K".

The "Sequence Editor" tab is active, showing a multi-line sequence with positions 1, 61, 121, 181, 241, 301, 361, 421, and 481. The sequence is as follows:

```

1 GCGCCATCA CCGCGTACGC CCAGCAGACA AGAGGCTCC TAGGATGCAT AATCACCAGC
61 CTAACCGGCC GGGACAAAA CCAAGCGGAG GGCAGGTCC AGATCGTGTC AACCGCCACC
121 CAAACCTTCC TGGCAACATG CATCAACGGG GTATGCTGGA CCGTCTACCA CGGGGCCGGA
181 ACAAGGACCA TCGCATCAC CAAAGGCCCC GTCATCCAAA TGTACACCAA TGTAGACCAA
241 GACCTCGTAG GCTGGCCCGC CCCCAAGGC ACCCGCTCAC TGACACCCTG CACCTGCGGC
301 TCTCGGACC TCTACCTGGT CACGAGGCAC GCCGATGTC TCCCGTGCG CCGGCAGGT
361 GACAGCAGGG GCAGCCTGCT CTCGCCCGG CCCATCTCT ACCTGAAAGG CTCTCGGGG
421 GGCCCACTGC TGTGCCCCGC GGGACACGCC GTAGGCATAT TCAGAGCCGC GGTATGCACC
481 CGTGGAGTGG CTAAGCAGT GACTTCATC CCCGTAGAGA ACCTAGAGAC AACCATGAGA
    
```

The "Primer Set 1" panel on the right shows the following primers:

- F1: ACGGCGTAAGCCAGCAGAC
- R1: AGCCGCACGTGCAGGGTGTCA
- S1: TCCACATGTAACCAAT

Below the primer set, there is a "Variable Positions" section with the following details:

- Name: Q80K
- Position: 9
- Type: SNP/Point Mutation
- Variation: Y
- Alleles: 1. C

The status bar at the bottom indicates "Position: 502" and "1 of 89".

Fig. 2

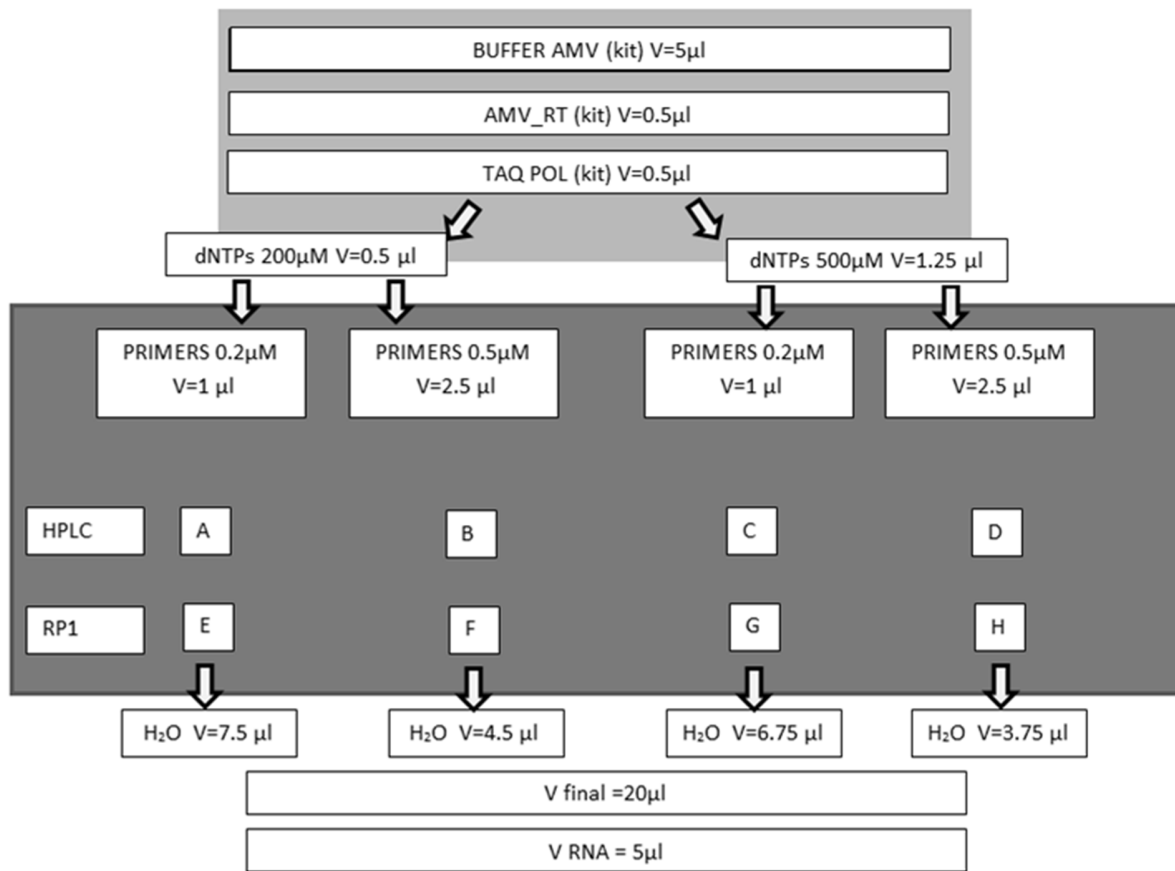


Fig. 3

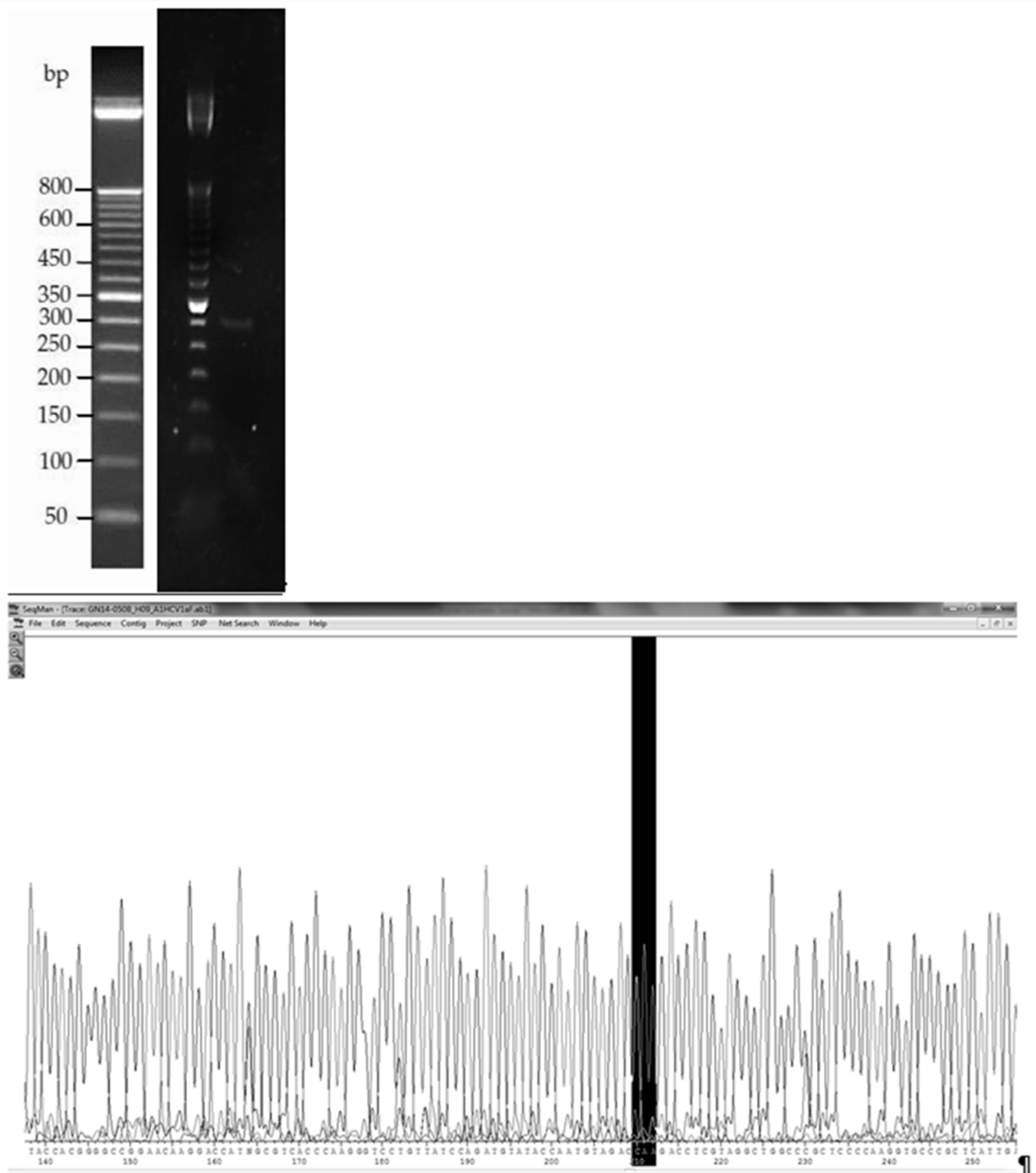


Fig 4

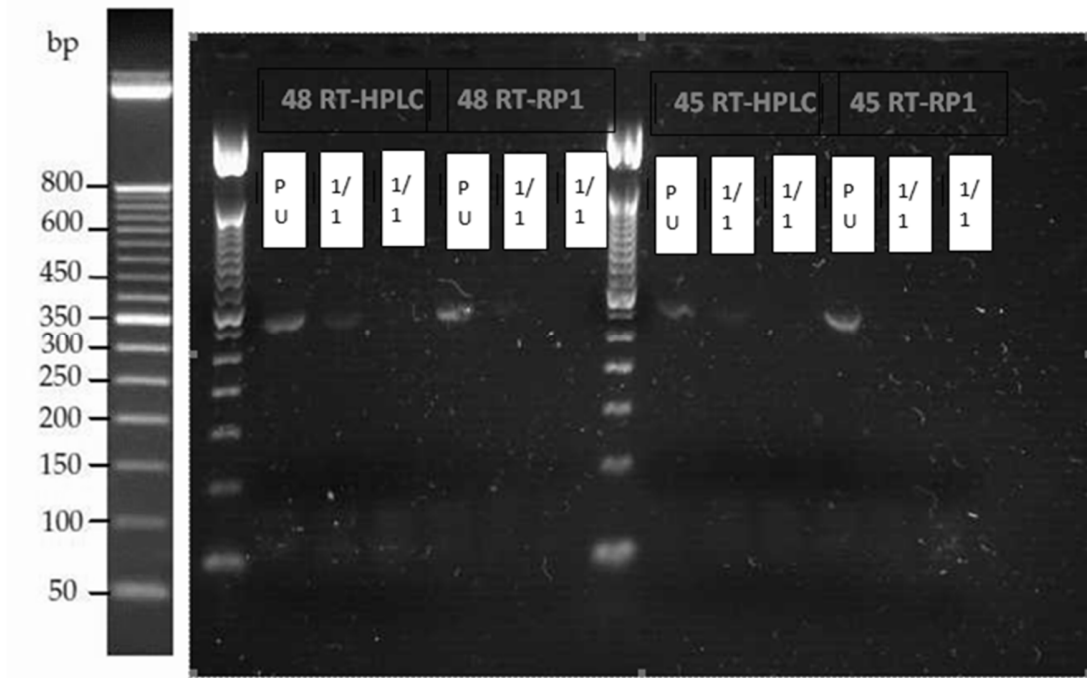


Fig. 5

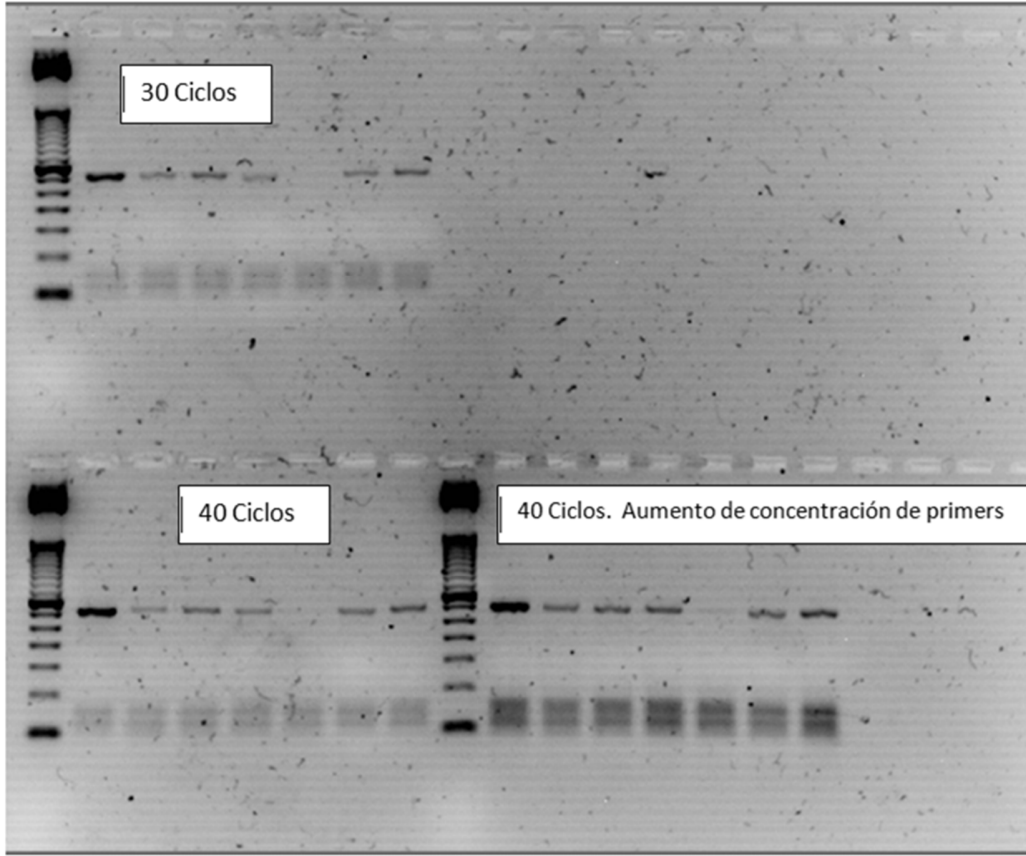
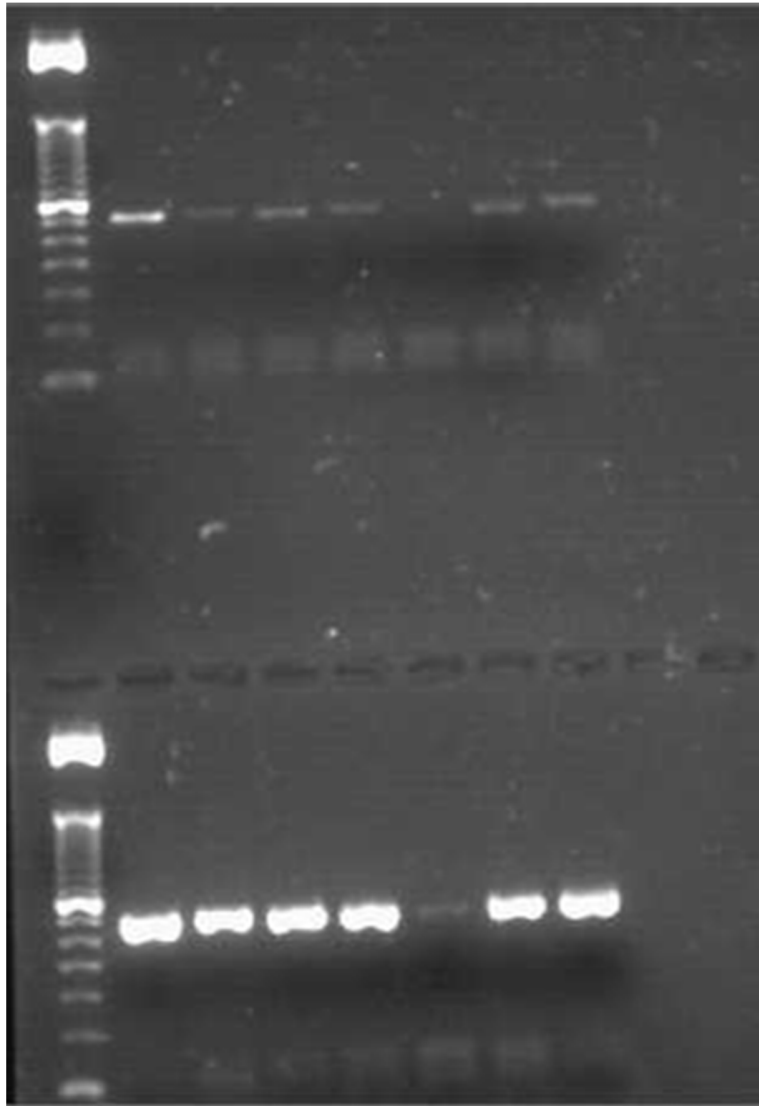


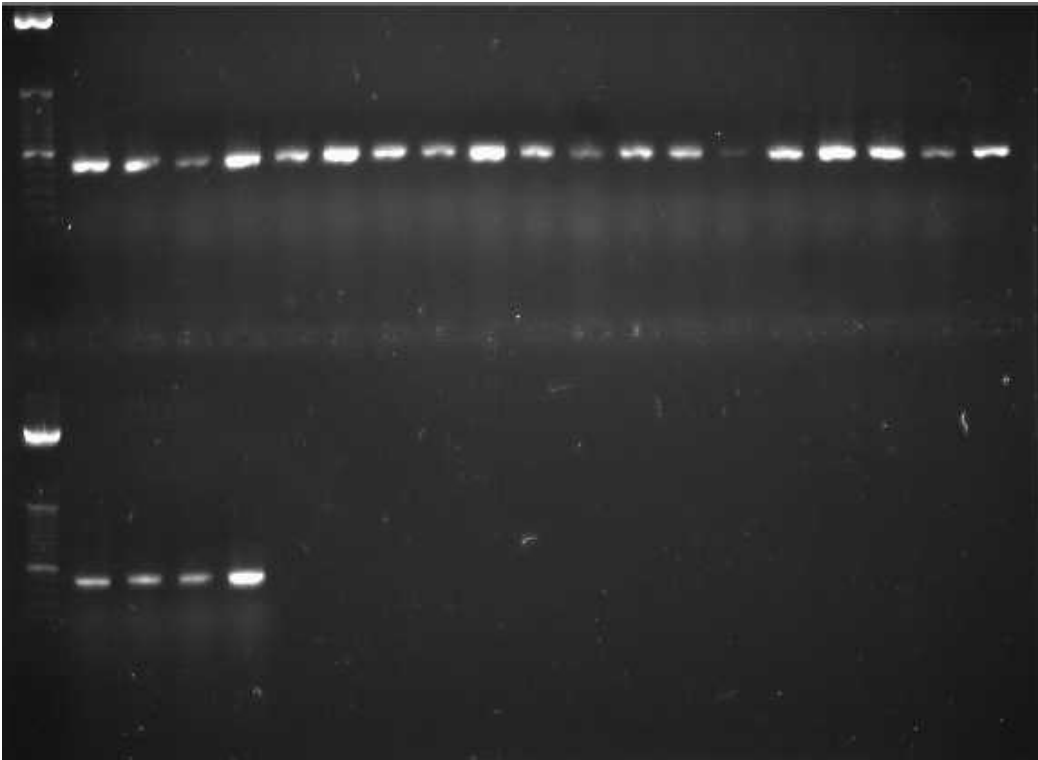
Fig. 6

<u>kit PROMEGA (50µl)</u>		CONDICIONES DE CICLADO:	
	1X		
5x Buffer AMV	10µl	45min	48°C
SO4Mg 4mM	5µl		
dNTPs 500 µM	2.5 µl	2 min	94°C
HCVPQ80K_F 0.5µM	6 µl	1min	93°C
HCVPQ80K_R 0.5µM	6µl	1min	58°C
Tfl taq (kit) 5U/µL	1 µl	1min	72°C
AMV-RT(kit) 5U/µL	1 µl		
H <sub>2</sub> O nucleases free	13.5 µl	10min	72°C
			} 40 ciclos
<u>kit Qiagen(50µl)</u>		CONDICIONES DE CICLADO:	
	1X		
5x Buffer	10µl	30min	50°C
dNTPs 400 µM	2 µl	15min	95°C
HCVPQ80K_F 0.6µM	6 µl	1min	94°C
HCVPQ80K_R 0.6µM	6µl	1min	58°C
Enz. Mix	2 µl	1min	72°C
SOLUCIÓN Q	10µl		
H <sub>2</sub> O nucleases free	9 µl	10min	72°C
			} 40 ciclos

**Fig. 7**



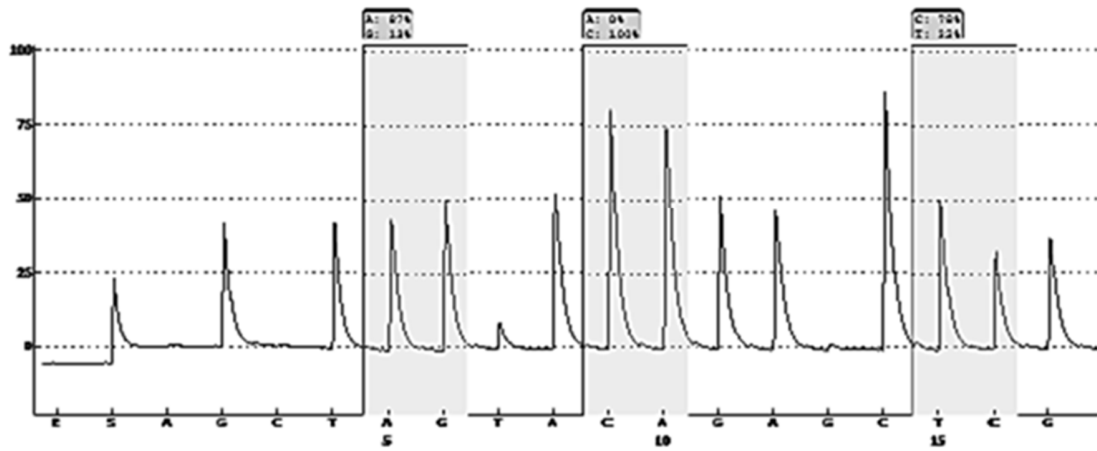
**Fig. 8**



**Fig. 9**

### Analysis result

Well: A1  
 Assay: Q80K  
 Sample ID: 13-13188348  
 Note:  
 Analysis version: 2.0.6



Sequence to analyze:  
 G1RGACMAAGACCTYGT

Position	1	2	3
Quality	Passed	Passed	Passed
A (%)	87	0	-
C (%)	-	100	78
G (%)	13	-	-
T (%)	-	-	22

No warnings.

Fig. 10

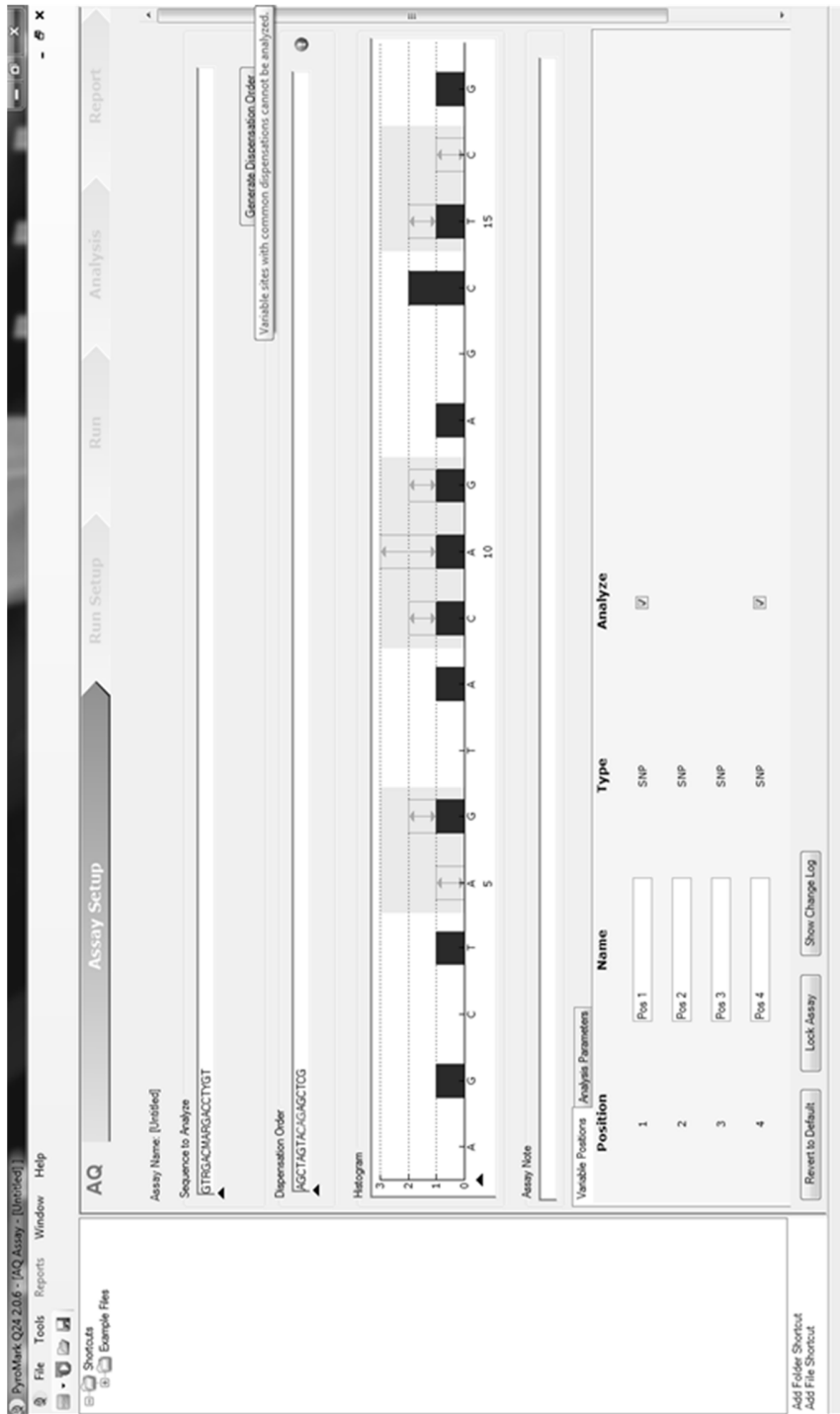


Fig. 11



Fig. 12



Fig. 13

Variable Positions | Analysis Parameters

Peak Height Threshold  
Required peak height for passed quality: 10  
Required peak height for check quality: 5

Stringency Levels

Pattern deviation in variable positions:  
 Low  Normal  High

Sum deviation in variable positions:  
 Low  Normal  High

Parameters  
A-peak reduction factor: 0.90

Revert to Default | Lock Assay | Show Change Log

Fig. 14

# ES 2 598 288 A2

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto de Salud Carlos III

<120> Kit y método para detectar y cuantificar las variantes naturales del virus de la hepatitis C, genotipo 1, subtipo a), que comprendan la mutación Q80K.

<130> 900445

<160> 23

<170> BISSAP 1.3

<210> 1

<211> 540

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Secuencia consenso

<220>

<221> misc\_feature

<222> 1..540

<400> 1

gcgcccatya cggcgtagc ccagcagacr agrggcctcy trggtrgyat aatyaccagc 60

ytracyggcc gggayaaraa ccargyggag ggygaggtyc agatygtgtc aacygcyrcc 120

caracyttyy tggcaacvtg catyaayggg gtrtgctgga cygtctacca yggggcyggr 180

acraggacca tygcrtcayc yaarggyccy gtyatccara tgtayaccaa tgtrgacmar 240

gacctytrg gytggccygc yccycarggy dcccgytcay tgacaccctg cacytgccgc 300

tcctcggacc tytaytggg cagaggcay gccgatgtca tycccgtgcg ccggcgrggt 360

gayagcaggg gcagcctgct ytcgccycgg ccyatytcyt acytgaargg ctcctcgggg 420

ggyccrctgy tgtgccccgc gggrcacgcc gtrggcatat tcagrgccgc ggtrtgyacc 480

cgtggagtgg ctaargcrgt ggacttyatc ccygtrgaga rcctagagac aaccatgagr 540

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> 1..20

<400> 2

acggcgtaag cccagcagac 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..21  
 <400> 3  
 agccgcacgt gcaggggtgc a 21

<210> 4  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 4  
 tccacatgta aaccaa 16

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..20  
 <400> 5  
 acrgcgtayg cycagcarac 20

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..21  
 <400> 6  
 agccgcargy gcarggygtc a 21

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..16  
 <400> 7  
 tccaratgta yacyaa 16

<210> 8

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de referencia con "n" en la posición 7  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1  
 <223> /nota="la secuencia de referencia comprendería Y dependiendo del primer utilizado "  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 7  
 <223> /nota="n = (3), donde (3) representa t o c"  
  
 <400> 8  
 ygtrganmaa gayctygt 18

<210> 9  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de referencia con "n" en la posición 7  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1  
 <223> /nota="la secuencia de referencia comprendería Y dependiendo del primer utilizado"  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 7  
 <223> /note="n = (3), donde (3) representa t o c"  
  
 <400> 9  
 ygtrganmaa gayct 15

<210> 10  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de referencia con T en la posición 7  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..17  
  
 <400> 10  
 tccacatgta aaccaat 17

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de referencia con C en la posición 7

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..17  
 <400> 11  
 tccaratgta yacyaat 17

<210> 12  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..17  
 <400> 12  
 tccaratgta yaccaat 17

<210> 13  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 13  
 tccaratgta yaccaa 16

<210> 14  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..17  
 <400> 14  
 tccaratgta yaccaat 17

<210> 15  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..16  
 <400> 15  
 tccaratgta yaccaa 16

<210> 16

<211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia particular de la SEQ ID NO 8  
  
 <400> 16  
 gtrgacmaag acctygt 17  
  
 <210> 17  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia particular de la SEQ ID NO 9  
  
 <400> 17  
 gtrgacmaag ayct 14  
  
 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 <400> 18  
 ygtrgacmar gacctygt 18  
  
 <210> 19  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de referencia con "n" en la posición 14 y 17  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1  
 <223> /nota="n en posición 14 = (2), donde (2) representa c o y"  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 7  
 <223> /nota="n en posición 17 = (1), donde (1) se entiende como la presencia o ausencia de t"  
  
 <400> 19  
 tccaratgta yacnaan 17  
  
 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de referencia para pirosecuenciación  
  
 <400> 20  
 gtrgacmarg acctygt 17