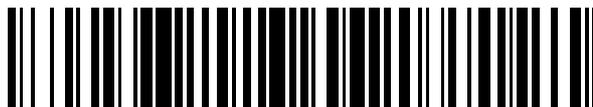


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 492**

21 Número de solicitud: 201330294

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**01.03.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.09.2014**

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

**26.03.2015**

Fecha de la concesión:

**21.07.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**29.07.2016**

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (67.0%)  
Avda. de la Constitución, 18  
41071 Sevilla (Sevilla) ES y  
UNIVERSIDAD DE JAEN (33.0%)**

72 Inventor/es:

**NEUKAM, Karin Isolde;  
CARUZ ARCOS, Antonio José y  
PINEDA VERGARA, Juan Antonio**

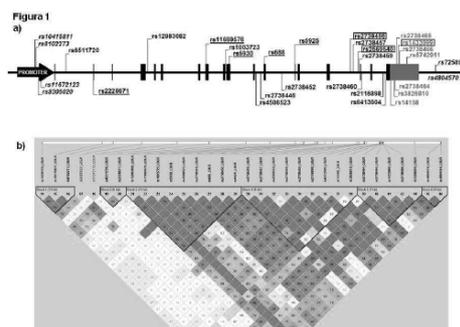
74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

54 Título: **Polimorfismos genéticos combinados de LDLR e IL28B para la predicción de la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C**

57 Resumen:

El uso de los polimorfismos genéticos rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, y rs6413504 del gen LDLR, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con VHC.



ES 2 490 492 B1

## DESCRIPCIÓN

Polimorfismos genéticos combinados de LDLR e *IL28B* para la predicción de la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C.

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro de la medicina y la biología molecular, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina, de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), y en concreto, al empleo del gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLR).  
 10 La predicción *a priori*, con datos genéticos, de los pacientes con mayor probabilidad de curación permitiría una mejor selección de los mismos, con el consecuente ahorro económico y mejora de la calidad de vida de dichos pacientes.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El ciclo de replicación viral está afectado por el colesterol y la biosíntesis de ácidos grasos.  
 15 La infección con VHC incrementa la biosíntesis lipídica y su almacenamiento en los hepatocitos, contribuyendo a la esteatosis asociada a VHC, hipobetalipoproteinemia y resistencia a la insulina. La inhibición de la producción de colesterol por medio del bloqueo de la HMG-CoA reductasa o de la **3** beta-hidroxiesteroide-delta 7-reductasa induce una marcada reducción en los niveles de ARN de VHC *in vitro*.

El ensamblado del virus VHC está estrechamente enlazado con la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y su vía secretora. Las partículas de VHC en suero se complejan con VLDL; aunque la estructura molecular exacta no es conocida, datos indirectos sugieren que VHC puede esconderse en el núcleo lipídico de VLDL, haciendo al VHC indetectable a anticuerpos y complemento del suero. Esta asociación con VLDL  
 25 permite al virus unirse a células diana a través de los receptores de lipoproteínas, después del procesamiento parcial por la lipoproteín-lipasa hepática, la cual hidroliza los triglicéridos en la VLDL dando lugar a IDL y LDL. Datos clínicos y experimentales sugieren que el receptor LDL (LDLR) es una molécula de acoplamiento o un co-receptor para VHC:

- 30 1) El nivel de ARN de VHC en hepatocitos primarios se relaciona con la expresión de ARNm de LDLR y la eficiencia en la captación de LDL.
- 2) LDLR soluble puede inhibir la infectividad de VHC.
- 3) Los niveles plasmáticos más elevados de LDL están asociados con la respuesta virológica sostenida (RVS) después del tratamiento con interferón pegilado (Peg-IFN) más ribavirina (RBV), probablemente debido al bloqueo competitivo de la entrada de  
 35 VHC.
- 4) Los polimorfismos en LDLR, los cuales están asociados con los niveles plasmáticos de LDL, tienen un impacto sinérgico en la probabilidad de lograr RVS con Peg-IFN y RBV en pacientes infectados con los genotipos virales 1-4, así como en la cinética viral después del tratamiento.

40 Sin embargo se mantienen algunas discrepancias. De esta manera, los experimentos 'tiempo de adición' con un anticuerpo monoclonal contra LDLR revela que LDLR tiene un mayor papel en las fases de post-entrada del ciclo de vida viral, probablemente incrementando la captación, un factor esencial para la replicación del VHC. Adicionalmente, cambios en la distribución intracelular del colesterol de la membrana plasmática a la red  
 45 membranosa puede interrumpir las balsas de superficie lipídica rica en colesterol, llevando a la represión de la vía de señalización JAK-STAT regulada por interferón. En el caso del virus

West Nile, la adición exógena de colesterol puede rescatar la señalización por interferón y restringir la replicación viral.

5 Cuatro estudios anteriores revelaron datos con respecto a la evolución clínica del VHC y de los polimorfismos genéticos de LDLR, no obstante, el papel de los polimorfismos genéticos en el metabolismo del colesterol, en la replicación del VHC, no está claro. Las principales ventajas de la presente invención están en la profundidad de los análisis genéticos de los genes más esenciales de las vías de transporte del colesterol, un denso reportaje de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en los genes LDLR, y el hecho de que no existen estudios previos que hayan estudiado una asociación de LDLR con el pre-  
10 tratamiento VL (carga viral). La identificación de los factores críticos del hospedador que modulan la replicación y la propagación del VHC, tiene el potencial de llegar a ser una nueva diana para medicamentos antivirales, centrada en la inhibición de la maquinaria celular destruido por la replicación viral.

15 El tratamiento de interferón pegilado más ribavirina presenta fuertes efectos secundario, y además tiene un coste medio de unos 8-10.000 euros por paciente. Sin embargo, la tasa media de curación alcanza sólo el 50-60% de los pacientes. Por ello, la predicción *a priori*, con datos genéticos, de los pacientes con mayor probabilidad de curación permitiría una mejor selección de los mismos; con el consecuente ahorro económico y mejora de la calidad de vida de dichos pacientes.

20 Es necesario, por tanto, encontrar un método y un kit de predicción de respuesta al tratamiento Peg-IFN y RBV.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

25 Los autores de la presente invención han evaluado la asociación de polimorfismos en genes de la síntesis del colesterol, así como de sus vías de transporte, en la respuesta viral sostenida pos-tratamiento y la carga viral del VHC.

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta viral sostenida (RVS) después del tratamiento con interferón pegilado más ribavirina del VHC. Los autores de la presente invención han encontrado un biomarcador útil para predecir la respuesta al tratamiento de la hepatitis C.

30 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los polimorfismos del gen *LDLR* para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con VHC.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de cualquiera de los polimorfismos (SNPs) que se seleccionan de entre: rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs1433099, rs6413504, o cualquiera de sus combinaciones, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con VHC. Una realización preferida se refiere al uso simultáneo de los polimorfismos (SNPs) rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs1433099 y rs6413504 para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento  
40 con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con VHC.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la respuesta al tratamiento es la respuesta virológica sostenida (RVS).

45 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el genotipo del VHC se selecciona de entre: genotipo 1, genotipo 2, genotipo 3, genotipo 4, o cualquiera de sus combinaciones.

El gen LDLR se localiza en el brazo pequeño del cromosoma 19, y contiene 18 exones codificando los seis dominios funcionales de la proteína madura: péptido señal, dominio de unión del ligando, factor tipo precursor de crecimiento epidermal (EGF), dominios transmembrana y citoplasmático.

5 La terapia antiviral va dirigida básicamente a lograr unos objetivos virológicos, bioquímicos e histológicos. La evaluación de la respuesta al tratamiento, se basa en el efecto del mismo sobre el estado virológico, no sólo al terminar el tratamiento sino, lo que es más importante, en su seguimiento después de finalizado el mismo. Tal y como se entiende en esta memoria, se denomina “respuesta virológica sostenida” o “respuesta viral sostenida” (RVS)  
10 la negativización de la viremia (ARN viral negativo mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa –PCR–) que se mantiene al menos 24 semanas después de finalizado el tratamiento; o dicho de otra manera, la ausencia en el suero del ARN-VHC a los 6 meses de finalizado el tratamiento.

15 La negativización de la viremia al final del tratamiento, con reaparición del ARN una vez terminado el mismo, define la “respuesta virológica con recaída”. La ausencia de negativización de la viremia al final del tratamiento define la “no respuesta virológica” al tratamiento.

20 El “interferón alfa” (IFN- $\alpha$ ) es una citocina inmunomoduladora que posee actividad antiviral, propiedades antiangiogénicas y antiproliferativas. El IFN-Peg se obtiene mediante la unión fisicoquímica de polietilenglicol (PEG) al interferón alfa (peginterferón  $\alpha$ -2a y  $\alpha$ -2b) recombinante, lo que aumentan su permanencia en la sangre requiriendo menor frecuencia de inyecciones.

25 Actualmente existen dos tipos de interferones pegilados comerciales cuya aplicación se ha extendido: peginterferón alfa-2a (Pegasys®, Roche) y peginterferón alfa-2b (Pegintron®, Schering-Plough). Estos dos productos son semejantes con respecto a su eficacia y seguridad pero sus regímenes de dosificación difieren levemente.

30 La ribavirina (1- $\beta$ -D-ribofuranosil-1H-1, 2,4-triazol-3-carboxamida) es un nucleótido sintético análogo de la guanidina, con propiedades antivirales y actividad inmunorreguladora. Fue una de las primeras drogas que demostró su eficacia para reducir la capacidad de reproducción de virus. Está descrita en el Índice Merck, compuesto N<sup>o</sup> 8199, undécima edición. Su fabricación y formulación se describen en la patente de EE.UU. n. No. 4.211.771.

35 La rápida captación eritrocitaria de la ribavirina y su fosforilación son responsables de la importante anemia hemolítica dependiente de la dosis. Con el fin de evitar este efecto indeseado, el diseño de los nuevos fármacos contempla que no sean captados o fosforilados por los eritrocitos o que sean captados rápidamente y fosforilados en el hígado. Ambos enfoques tienen la desventaja potencial de que pueden anular pasos fundamentales que contribuyen con la eficacia terapéutica de la ribavirina.

Otros derivados, profármacos o análogos de la ribavirina son la viramidina y la levovirina.

40 La viramidina es un profármaco de la RBV, en el hígado se convierte en RBV por acción de la adenosindeaminasa hepática. La RBV y viramidina son rápidamente eliminadas, sus moléculas y los metabolitos son excretados por el riñón y tienen una T<sub>máx</sub> de 1,5-3 h. Experimentalmente, la retención hepática de la RBV derivada de una dosis oral de viramidina es 3 veces mayor que la RBV oral. En cambio, la concentración de fosfatos de  
45 RBV en los hematíes es mucho menor, de ahí que se pueda mantener una concentración más estable de hemoglobina. Es un fármaco seguro y se tolera bien. Los efectos adversos con dosis de 200, 600 y 1.200 mg fueron: 0, 26 y 50%, respectivamente; la mayoría leves y desaparecieron sin secuelas.

La levovirina es la L-enantiomero de la RBV y no origina anemia hemolítica. Tiene una actividad inmunomoduladora similar a la RBV, pero no tiene actividad antiviral directa.

Otros posibles análogos se describen, por ejemplo, pero sin limitarnos, en la patente WO 2010/135520.

- 5 La ribavirina por sí sola no es eficaz contra el VHC, pero cuando se la combina con interferón, los índices de erradicación viral son mucho mejores comparados con aquellos logrados solamente con interferón.

La carga viral es la cantidad de ARN del VHC en un mililitro de sangre. Hay dos tipos principales de pruebas de carga viral para el VHC:

- 10 - Las pruebas cualitativas de carga viral determinan la presencia de ARN del VHC (código genético) en la sangre. Este tipo de prueba se usa generalmente para confirmar una infección crónica con el VHC. Si se detecta ARN viral, se reporta un resultado positivo. Si no se detecta ARN viral, el resultado es negativo. Hasta un 15% de las personas infectadas con el VHC eliminan la infección sin tratamiento. Estas personas tienen una  
15 prueba de anticuerpos positiva y una prueba de carga viral negativa.

- Las pruebas de carga viral cuantitativas miden la cantidad de virus en un mililitro de sangre. Generalmente se usan para evaluar si el tratamiento con interferón o con interferón más ribavirina tendrá posibilidades de tener éxito y luego, si el tratamiento está funcionando.

20 Existen técnicas diferentes, sin limitarnos, para la cuantificación del virus VHC:

- Reacción en cadena de polimerasa (PCR). Esta prueba mide copias del código genético del VHC. La prueba PCR es muy sensible.
- Cadena ramificada de ADN (bDNA, siglas en inglés). Esta prueba es menos sensible que la PCR. Sin embargo, es más barata.
- Amplificación mediada por la transcripción (TMA, siglas en inglés). Esta tecnología es extremadamente sensible. Se está volviendo más rápida y menos cara.

Las diferentes pruebas pueden dar resultados diferentes en una misma muestra. Debido a que las pruebas son diferentes, debería usar el mismo tipo de pruebas para medir su carga viral a través del tiempo.

- 30 El “genotipo del VHC”, o “cepa viral” se determina por una prueba de sangre. El virus de la hepatitis C se ha clasificado en seis genotipos distintos en base a diferencias en sus genomas, estos genotipos a su vez se subdividen. La preponderancia y distribución de dichos genotipos varía de modo global. Por ejemplo, en Norte América predomina el genotipo 1, seguido de 2 y 3. En Europa predomina el genotipo 1 seguido de 3, 4 y 2. Los  
35 genotipos 4 predomina en Egipto, 5 se da casi exclusivamente en África y genotipo 6 en el sudeste asiático.

- Tal y como se entiende en esta memoria, se denomina “respuesta virológica sostenida” o “respuesta viral sostenida” (RVS) la negativización de la viremia (ARN viral negativo mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa –PCR–) que se mantiene al  
40 menos 24 semanas después de finalizado el tratamiento; o dicho de otra manera, la ausencia en el suero del ARN-VHC a los 6 meses de finalizado el tratamiento.

Las secuencias nucleotídicas de los polimorfismos son las siguientes:

rs2738456

GACAAGAGTGAAACTCCATTCCCCTC [C/T] GCAAAGAAAAGGAATATTATCAGAT

rs2738457

ATTCATTCATTCATTTATGTAGAGAC [A/G] AGGGGGATCTGGCTATATTGCCTAG

5 rs2569540

CAGGTGAAATTCTTGTCAACCTACTT [C/G] TGCATTTTATTAATAATGAGCATATT

rs2738459

TAGCCAGACCTCTGTTTCTATCCCC [A/C] CAAAAGAACCTTCTTAAACCGGAA

rs2738460

10 CCAGCGTCCCCCAGGTCACAGCCTCC [C/T] GCTATGTGACCTCGTGCCTGGCTGG

rs2116898

TTCCCCCAGGAGCCGCCAGAGGGAGA [C/T] GGTGAGTACCGGATTCAGTCACTTC

rs1433099

GCACTTAATAAATATTAAGGGTGACC[A/G]GTGACTCAGGCTCTGCCTCTGGGAA

15 rs6413504

AGGTGGCCTCCAGCCGTGTTTCCTGA [A/G] TGCTGGACTGATAGTTTCCGCTGTT

Otro aspecto de la invención se refiere al uso simultáneo de los genes *LDLR* e *IL28B* para predecir o pronosticar la carga viral del individuo.

20 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES, MÉTODO DE PRONÓSTICO Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con VHC, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

25

a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y

b) detectar los polimorfismos genéticos: rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs1433099 y rs6413504 del gen *LDLR*, en la muestra biológica aislada de (a).

30 En una realización preferida, la respuesta al tratamiento es la respuesta virológica sostenida del VHC.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende medir la carga viral del VHC en un individuo.

35 Más preferiblemente, además comprende determinar los polimorfismo del gen *IL28B*. aún más preferiblemente los polimorfismos del gen *IL28B* son el rs12979860 y/o rs8099917.

Las secuencias nucleotídicas de los polimorfismos son:

rs12979860

CTGAACCAGGGAGCTCCCCGAAGGCG [C/T] GAACCAGGGTTGAATTGCACTCCGC

rs8099917

CTTTTGTTCCTTTCTGTGAGCAAT [G/T] TCACCCAAATTGGAACCATGCTGTA

5 El receptor de LDL (LDLR) puede actuar como co-receptor para el VHC. Los autores de la presente invención han determinado que distintos genotipos del gen LDLR, pueden influir en la carga viral del VHC y la RVS, como por ejemplo el alelo C del SNP rs2738459 de LDLR es un factor de riesgo y está relacionado con una mayor VL en los genotipos 2-3 de VHC. Ciertos genotipos de este gen en combinación a genotipos del gen IL28B, también tienen influencia en la respuesta viral sostenida. La combinación entre los genotipos de LDLR e IL28B mostraron un efecto sinérgico sobre la RVS en pacientes infectados con los genotipos 1-4 de VHC, cuando individuos homocigóticos portadores de genotipos IL28B protectores fueron clasificados de acuerdo a los genotipos LDLR rs2738457, la frecuencia de RVS fue 0.73 para AA versus 0.26 en AG+GG.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para predecir o pronosticar la respuesta virológica sostenida del VHC, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) del primer método de la invención, y además comprende:

c) clasificar a los individuos según el genotipo LDLR que presentan y su respuesta virológica sostenida del VHC al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina.

15 En una realización preferida, este método, además comprende:

d) clasificar a los individuos según el genotipo LDLR y su carga viral del VHC.

En otra realización preferida el individuo está infectado por los genotipos 1, 2, 3 y 4 del VHC, o cualquiera de sus combinaciones.

25 En otra realización preferida, el paso (b) de cualquiera de los métodos de la invención, además comprende determinar el genotipo del gen *IL28B*.

En otra realización preferida la determinación del genotipado se realiza mediante PCR. En una realización aún más preferida, se usa el análisis de haplotipos.

30 Los pasos (b) y/o (c) y/o (d) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computarizada en los pasos (c) y (d).

35 El término "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, como sangre, suero, orina, saliva, fluido cerebroespinal, o a una muestra sólida o semisólida, como tejidos, heces, y similar, o alternativamente, un tejido sólido tales como aquellos usados habitualmente en diagnóstico histológico, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

40 Existen más de 100 métodos distintos de genotipado de SNPs, siendo cualquiera aplicable en la presente invención. Por ejemplo, sin limitarnos, puede detectarse empleando desde enzimas de restricción o por secuenciación simple mediante PCR, sondas ASO e hibridación en Micromatrices de ADN o esferas. Así, por ejemplo, como métodos de amplificación de SNPs se encuentran la PCR, el método Invader, la amplificación por ADN de círculo rodante, etc. Como métodos de discriminación alélica, pueden emplearse, pero sin limitarnos, hibridación específica de alelo, ligamiento de oligonucleótidos específicos de alelo, minisequenciación o extensión de sondas (SBE, Single Base Extension), rotura

invasiva específica de alelo (Invader), etc. Según el formato de detección, podemos citar, también sin limitarnos, el uso de sondas Taqman, de molecular beacons, scorpion, etc. Respecto a reacciones en un soporte sólido, tenemos, por ejemplo, biochips y microarrays de ADN, u otros métodos que emplean partículas, como por ejemplo, Luminex 100, BeadArray, etc. También existen métodos de detección masiva, como la pirosecuenciación, o la miniaturización.

Un haplotipo es un conjunto de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en un cromosoma particular que están físicamente asociados heredándose como un bloque con muy poca o nula recombinación genética entre ellos. Los análisis genéticos asociación de haplotipos pasan por ser una poderosa estrategia hacia el descubrimiento de genes que predisponen a las enfermedades humanas complejas.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

### KIT O DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO, MICROARRAY Y USOS

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de aquí en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar el genotipo del gen *LDLR*.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar el genotipo del gen *LDLR* por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Preferiblemente, el kit o dispositivo que comprende una o varias secuencias nucleotídicas necesarias para detectar los polimorfismos del gen *LDLR*. Más preferiblemente los polimorfismos del gen *LDLR* se seleccionan de entre: rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs1433099, rs6413504, o cualquiera de sus combinaciones.

Es también posible que el (los) oligonucleótido(s) o sondas estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, que normalmente corresponde a una secuencia concreta de ADN. Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende al menos una sonda para detectar el genotipo del gen *LDLR*.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie de un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3'

mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

5 Así, las sondas oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos. Para la cuantificación de la expresión génica, preferiblemente se emplean aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.

10 La síntesis in situ sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

15 Más preferiblemente, el kit o dispositivo, y/o el microarray además comprende una o varias sondas necesarias para detectar el haplotipo del gen *IL28B*. Preferiblemnete comprende las sondas necesarias para detectar los polimorfismos rs12979860 y el rs8099917.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo, la micromatriz, o el microarray de la invención, para predecir o pronosticar la respuesta, en pacientes infectados con VHC, al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina. En una realización preferida, el kit o dispositivo, la micromatriz o el microarray, comprende además la capacidad de predecir o pronosticar la carga viral del VHC.

En otra realización preferida el individuo está infectado por los genotipos 1, 2, 3 o 4 del VHC, o cualquiera de sus combinaciones.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

35 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA). Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados

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

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1:** Estructura génica del gen LDLR y patrón del desequilibrio de ligamiento de la población analizada. Una representación gráfica del gen LDLR con las posiciones de los polimorfismos genotipados. La codificación de los SNPs está subrayada, los SNPs asociados con la carga viral están en cajas. '3 UTR en gris, y el resto de los exones en negro. B, patrones de desequilibrio de seguimiento en la población de estudio. Los valores  $D'$  fueron calculados y trazados con Haploview. Los números dentro de las cajas, corresponden a  $D' \times 100$ ;  $D'$  no están representados. Una estructura de bloque fue considerada para pares de marcadores, mostrando  $D' > 0.8$ , seguido de la definición de bloque de columna sólida en Haploview.

**Fig. 2:** Comparación de VL entre pacientes portadores de polimorfismos LDLR rs1433099 (lado izquierdo) y rs2569549 (lado derecho). A, pacientes infectados con los genotipos 1-4 de VHC ( $p=0.0001$  rs1433099;  $p=0.007$  rs2569540 prueba de Mann Whitney). B, pacientes infectados con los genotipos 2-3 de VHC ( $p=0.18$  rs1433099;  $p=0.82$  rs2569540, prueba de Mann Whitney).

**Fig. 3:** Relación entre el polimorfismo rs28416813 de IL28B y respuesta viral sostenida ( $p=0.000003$ , Fisher exact test).

**Fig. 4:** Interacción entre rs2738457 de LDLR y rs28416813 de IL28B en relación con la respuesta viral sostenida. a) IL28B GG fondo genético protector  $p=0.0006$ , Fisher exact test. B) IL28B CC+CG fondo genético de riesgo,  $P=0.72$ , Fisher exact test.

**Fig. 5:** Asociación entre VHC VL y la presencia de 1 o 2 copias del haplotipo extendido AGGCGGAG de los SNPs rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs6413504, rs14158 en pacientes infectados con los genotipos 1-4 de VHC. a), asociación con el nivel umbral de VL de 60000 UI/ml ( $p=9 \times 10^{-6}$ , prueba exacta de Fischer). b), asociación del haplotipo AGGCGGAG con el log10 de carga viral del VHC ( $p=8 \times 10^{-5}$ , prueba de Mann Whitney).

**Fig. 6:** Asociación entre VHC VL y la presencia de 1 o 2 copias del haplotipo compacto AGGC/GGCC de los SNPs rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459 en pacientes infectados con los genotipos 1-4 del VHC. a), asociación con el nivel umbral de VL de 60000 UI/ml ( $p=7 \times 10^{-4}$ , prueba exacta de Fischer). b), asociación con el log10 de carga viral del VHC ( $p=8 \times 10^{-4}$ , prueba de Mann Whitney).

**Fig. 7:** Asociación entre el haplotipo compacto de LDLR que incluye los SNPs rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459 y el genotipo de la IL28B con RVS. a) Todos los genotipos de IL28b ( $p=0,016$ ). b) genotipos protectores de IL28B (0,005) c) genotipos de riesgo de IL28B ( $p=0,055$ ). Fisher exact test.

## EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

### Métodos

#### Población de estudio

Una población de 442 pacientes infectados con VHC fue reclutada posteriormente en unidades de enfermedades infecciosas de 5 hospitales en España (Sevilla, Córdoba, Madrid, Málaga y Huelva) desde Mayo de 2000 a Diciembre de 2010. Todos ellos estaban sin tratamiento de VHC. Se desarrollaron controles clínicos y de laboratorio en la visita inicial y las muestras de sangre y/o plasma fueron recogidas y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posteriores determinaciones genéticas, bioquímicas y virológicas. 239 pacientes estaban

infectados con VHC genotipo 1, 62 con el genotipo 4, 141 con el genotipo 3, y un individuo con el genotipo 2. Durante el tratamiento, los pacientes fueron evaluados cada 4 semanas durante las primeras 24 semanas de tratamiento, cada 8 a 12 semanas más tarde, incluyendo una visita 24 semanas después de completar la terapia para evaluar la respuesta virológica sostenida (RVS). Se realizaron controles clínica y de laboratorio en cada visita, y las muestras de sangre y/o plasma fueron recogidas y almacenadas a -70°C para posteriores determinaciones genéticas y virológicas.

### Aspectos éticos

El estudio fue diseñado y desarrollado de acuerdo con la declaración de Helsinki, y fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Valme. Todos los pacientes firmaron un informe de consentimiento para participar en el estudio.

### Determinaciones clínicas en laboratorio

Los anticuerpos séricos de VHC fueron determinados por un inmunoensayo enzimático (EIA) (ADVIA Centaur XP, Siemens Healthcare Diagnostics S. L. Tarrytown, NY, USA). La carga plasmática de ARN de VHC fue medida por ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real, de acuerdo a la técnica disponible en el momento que cada paciente fue tratado (Cobas Amplicor VHC monitor; Roche Diagnostic Systems Inc., Branchburg, NJ, USA: límite de detección 600UI/ml; Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan; Roche Diagnostics Systems Inc., Meylan, Francia: límite de detección 50 UI/ml; Cobas TaqMan; Roche Diagnostics Systems Inc., Pleasanton, CA, USA: límite de detección 10 UI/ml). El genotipo del VHC se determinó con el Versant HVC genotype 2.0 LIPA; Siemens (Tarrytown, NY, USA). LDL, HDL, colesterol total (tCol) y triglicéridos fueron medidos por procedimientos estándar rutinarios en los departamentos de bioquímica clínica de los hospitales participantes.

### Selección del polimorfismo y genotipado

Los SNPs del metabolismo y transporte del colesterol (tabla 1), previamente asociados con RVS o fibrosis hepática, fueron seleccionados de acuerdo a 2 criterios, primero, los datos del genotipo de la población de Hapmap-CEU fueron directamente descargados de la base de datos Hapmap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) y la etiqueta SNP2 fue identificada usando la opción etiquetadora del software Haploview's V4.1 ([www.broad.harvard.edu/haploview/haploview](http://www.broad.harvard.edu/haploview/haploview)); segundo, la listas de SNPs fueron completadas con polimorfismos potencialmente funcionales, previamente asociados tanto con VHC espontáneo o con fibrosis hepática. El ADN fue extraído de células frescas mononucleares de sangre periférica o de sangre total congelada, usando el kit de extracción Quick Pure Blood DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) o el sistema Magna Pure (Roche, Basel, Switzerland). Los SNPs fueron genotipados usando un Golden Gate Veracode genotyping assay (Illumina, San Diego, California USA) en el departamento de genómica estructural de Neocodex Inc. (Sevilla, España) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

### Bioestadística y bioinformática

Los valores de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los marcadores genéticos estudiados (medidos en el coeficiente de desequilibrio estandarizado de Lewontin), las frecuencias de haplotipo, y análisis de asociación basados en haplotipo fueron calculados usando los software Haploview v4.1, Plink V1.07 y SPSS v14. Los efectos de haplotipo son expresados como odds ratio (para análisis binario de casos y controles) o como diferencia media (para valores numéricos de carga viral). Los test de asociación de haplotipos fueron ajustados usando una corrección de Bonferroni para test múltiples por división del nivel de significación (.05) por el número de haplotipos principales. (>5%). Un valor de  $p < 0.0025$  fue considerado significativo estadísticamente (corregido para 20 tests) para el análisis de haplotipos asumiendo un riesgo de subestimación dado la falta inherente de independencia de análisis

de haplotipos. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado usando el software Haploview V4.1 y el test adaptado de Sasieni (1997) del recurso on-line del instituto para la genómica humana, Munich, Alemania ([www.ihg.gsf.de](http://www.ihg.gsf.de)). Marcadores únicos, frecuencias de haplotipo y las fases del cromosoma fueron estimados y comparados usando el software PLINK, complementado con el software de implementación gPLINK basado en Java (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/gplink.shtml>). La asociación alélica estándar caso/control (1 grado de libertad) así como diferentes modelos genéticos: dominante, recesivo y general (2 grados de libertad), fue hecho usando el test exacto de Fischer, adicionalmente fue usado el test de tendencias Cochran-Armitage para probar la asociación genotípica. Los modelos genéticos aditivos fueron probados usando el test de tendencias Armitage. Log<sub>10</sub> VHC VLs fueron probados por asociación, usando el test ratio de probabilidad asintótica y el test Wald (software Plink) así como la prueba de Mann-Whitney.

Se desarrollaron análisis complementarios usando el software SPSS (versión 14.0). Los valores p de asociación de marcador único, fueron corregidos por múltiples pruebas (*multiple testing*) seguidas de un enfoque de descomposición espectral de SNP, en todo el experimento el umbral de significación estadística requerido para mantener la tasa de error al 5% fue 0.0005.

## RESULTADOS

### Estadísticas de genotipado.

Cinco SNPs no pasaron los controles de calidad del genotipado del protocolo de Illumina Veracode Golden Gate: rs1800796 (IL6), rs5742911 (LDLR), rs673 (TNFA), rs7412 (APOE) and rs7491 (LDLRAP1). Además, 8 SNPs fueron mono mórficos en nuestra población con solo un alelo detectado rs12713911, rs12720791, rs12720794, rs1801703, rs7589300 (APOB), rs2069830 (IL6), rs6880589 (HAVCR1) y rs71638390 (LDLRAP1). Los SNPs rs4418583 (LDLRAP1) y rs1131454 (OAS1) fueron descartados debido a la desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg. Las tasas medias de genotipado del resto de los SNPs fueron 99.2% (SD2.09).

### Análisis de asociaciones genéticas univariante de VL.

Los valores plasmáticos de VHC VL fueron caracterizados de acuerdo a nivel umbral de corte de 600000 UI/ml, en paralelo se realizaron también análisis de asociación cuantitativa. Cuando se analizaron las variables continuas, los valores VL fueron expresados como Log<sub>10</sub>. Solo el marcador rs2569540 de LDLR mostró una asociación límite bajo el modelo dominante en el uso del nivel de corte de 600000 UI/ml (odds ratio=1.74; p=0.009). Cuando los pacientes clasificados de acuerdo al genotipo VHC (tabla 2), encontramos asociación entre pacientes infectados con los genotipo 1-4 de VHC bajo el modelo dominante con los genotipos AA+AG de rs11672123 localizados en la región distal promotora de LDLR (p=0.001; OR: 2.3; 95% CI [1.359-3.917]), los genotipos AA+AG de rs1433099 posicionados en el extremo 3' a la región no traducida de LDLR (p=0.0004, OR=0.41, 95% CI [0.22-0.66]) y rs2569540 GG+GC (p=0.0023; OR=0.45, 95% CI [0.277-0.761]) localizado en el intrón cerca del extremo 3' terminal del gen (Figura 1<sup>a</sup>). El alelo C de rs2738459 de LDLR es un factor de riesgo y está relacionado con una mayor VL en los genotipos 2-3 (OR: 4.29; p=0.0002, 95% CI [1.930-9.558]). Asociaciones de rs1433099 y rs2738459 con VL alcanzaron significación estadística después de la corrección por *multiple testing*. Las localizaciones de los SNPs en el gen de LDLR están representadas en la Figura 1.

El análisis de asociación cuantitativa del log<sub>10</sub> de VL, demostró asociación solo con el rs2569540 de LDLR (media±SD; CC 6.22±0.9 vs. GG+CG 5.8±0.9, p= 0.0007, Prueba de Mann-Whitney) y rs1433099 (media±SD; GG 6.2±0.9 vs. AA+AG 5.8±0.9, p=0.0001, Prueba de Mann-Whitney), pero solo para los genotipos virales 1-4 (Figura 2). La asociación de

rs2738459 con la VL estratificada de acuerdo al nivel de corte de 600000 UI/ml para el genotipo 3, no fue confirmada en el análisis cuantitativo.

5 Ninguno de los demás genes estudiados (tabla 1) parece estar relacionados con el fenotipo VHC VL. La relación entre la respuesta virológica sostenida fue analizada también, pero  
ninguno de los SNPs mostró nivel significativo de asociación bajo condiciones de *multiple testing*, los mejores SNPs fueron rs2738457 cercano a rs2569540 (alelo A, 0.275 no-RVS, 0.199 RVS;  $p=0.037$ ). Por el contrario, la combinación genotípica CC + CG del SNP de  
10 IL28B rs28416813 tiene una frecuencia del 0.30 en RVS versus 0.69 en no respondedores (figura 3,  $p=2 \times 10^{-6}$ ). La combinación entre los genotipos de LDLR e IL28B mostraron un efecto remarcable sobre la RVS en los genotipos 1-4, cuando individuos homocigóticos portadores de genotipos IL28B protectores fueron clasificados de acuerdo a los genotipos LDLR rs2738457, la frecuencia de RVS fue 0.73 para AA versus 0.26 en AG+GG ( $p=6 \times 10^{-4}$ ) (figura 4). Esta interacción de IL28B y LDLR no fue observada en pacientes con genotipos de riesgo IL28B que mostraron una frecuencia de RVS de 0.29 en AA versus 0.29 en  
15 AG+GG  $p=0.72$  (figura 4).

### Análisis haplotípicos

Una prueba de asociación basada en haplotipo fue desarrollada por un análisis de regresión multi-marcador usando el software Plink. Las frecuencias de haplotipo fueron estimadas y comparadas independientemente para pacientes infectados con genotipos 1-4 o 2-3 (tabla  
20 2) Los SNPs de LDLR incluidos en este estudio abarcan 92.6 Kb (de rs1529729 a rs4804146). El desequilibrio de ligamiento del gen LDLR fue calculado en pacientes infectados con genotipos virales 1-4 y 2-3 y mostró que en ambas poblaciones los SNPs con asociación significativa univariante con VL eran independientemente informativos y estaban contenidos en el interior de 3 bloques haplotípicos, los cuales eran similares a la estructura del bloque en el basa de datos HapMap Phase II (Figura 1b). La tabla 2 muestra las frecuencias de haplotipos importantes en nuestra cohorte para los 3 haplotipos identificados. La presencia (1 o 2 copias) de un haplotipo extendido que abarca las últimos 3 exones de LDLR, incluyendo la combinación AGGCGGAG de los SNPs rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs6413504, rs14158 mostraron una fuerte  
25 asociación con el nivel de carga viral con umbral de corte de 600000 UI/ml para los genotipos 1-4 ( $OR=0.27$ ;  $p=3 \times 10^{-6}$ , Figura 3<sup>a</sup>), así como una cuantitativa VL (media $\pm$ SD;  $6.19 \pm 0.9$  vs. CC+CG  $5.58 \pm 1.1$ ,  $p=0.0001$ ), figura 5). Sin embargo, este haplotipo no tiene efectos significativos en *multiple testing* para los genotipos virales 2-3.

Un haplotipo compacto, incluyendo los primeros 4 SNPs rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459 del largo haplotipo, permite capturar la mayor parte de la información de la  
35 región; los haplotipos AGGC y GGCC de estos 4 marcadores están asociados con cargas virales más bajas según el nivel umbral de 600.000 copias ( $OR=0.32$ ;  $P=2 \times 10^{-5}$ ) así como con la carga viral cuantitativa ( $p=8 \times 10^{-4}$ ) en pacientes infectados con los genotipos 1-4. Los genotipos IL28B no modifican el efecto de haplotipos LDLR en carga viral ( $p=0.33$  para haplotipos AGGC+GGCC y  $p=0.055$  para haplotipos AGCA+GACC) (figura 6).

Los haplotipos de LDLR modifican el efecto de IL28R en RVS, los pacientes portadores de los haplotipos AGGC/GGC desarrollaron tasas más altas de RVS comparadas con los pacientes AGCA/GACC (0.52 versus 0.36  $p=0.016$ ), sin embargo, si los pacientes están clasificados de acuerdo al genotipo IL28B, se observa un notable impacto en los haplotipos  
45 de LDLR. Si los portadores del genotipo protector IL28B están clasificados de acuerdo a los haplotipos LDLR, el grupo AGGC/GGCC alcanzaron 78.9% de RVS comparados al 48.6% del grupo AGCA/GACC ( $p=0.005$ ). Esta tendencia no fue observada en pacientes portadores del genotipo de riesgo de IL28B, donde el genotipo de LDLR no tienen influencia en la probabilidad de RVS ( $p=0.55$ ) (figura 7).

Table 1: SNPs incluidos en este estudio.

SNP name	Chr	Coordinate	Gene	Location	Coding Status
rs71638390	1	25889161	<i>LDLRAP1</i>	CODING	NONSYN
rs6687605	1	25889632	<i>LDLRAP1</i>	CODING	SYNON
rs28969504	1	25890189	<i>LDLRAP1</i>	CODING	NONSYN
rs4075184	1	25890835	<i>LDLRAP1</i>	INTRON	
rs4418583	1	25893242	<i>LDLRAP1</i>	INTRON	
rs11563	1	25894853	<i>LDLRAP1</i>	UTR	
rs7491	1	25895238	<i>LDLRAP1</i>	UTR	
rs17111503	1	55503448	<i>PCSK9</i>	INTERGENIC	
rs2479408	1	55504188	<i>PCSK9</i>	INTERGENIC	
rs2479409	1	55504650	<i>PCSK9</i>	INTERGENIC	
rs11591147	1	55505647	<i>PCSK9</i>	CODING	NONSYN
rs10888896	1	55509213	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs4927193	1	55509872	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs499718	1	55512549	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs10888897	1	55513061	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs676297	1	55514611	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs572512	1	55517344	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs2495477	1	55518467	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs2479413	1	55518682	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs7552841	1	55518752	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs557435	1	55520864	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs483462	1	55525400	<i>PCSK9</i>	INTRON	

ES 2 490 492 B1

rs603247	1	55525868	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs10465832	1	55528807	<i>PCSK9</i>	INTRON	
rs505151	1	55529187	<i>PCSK9</i>	CODING	NONSYN
rs662145	1	55529828	<i>PCSK9</i>	UTR	
rs2254002	1	65301669	<i>JAK1</i>	INTRON	
rs2236876	1	173017486	<i>TNFSF18</i>	INTRON	
rs486907	1	182554557	<i>RNASEL</i>	CODING	NONSYN
rs4290029	1	224400640	<i>DEGS1/NVL</i>	INTERGENIC	
rs1801702	2	21225485	<i>APOB</i>	CODING	NONSYN
rs1801703	2	21225912	<i>APOB</i>	CODING	NONSYN
rs12713771	2	21235565	<i>APOB</i>	INTRON	
rs3749054	2	21237238	<i>APOB</i>	INTRON	
rs673548	2	21237544	<i>APOB</i>	INTRON	
rs2854725	2	21237786	<i>APOB</i>	INTRON	
rs12713844	2	21238413	<i>APOB</i>	CODING	NONSYN
rs11126598	2	21240364	<i>APOB</i>	INTRON	
rs12713911	2	21240538	<i>APOB</i>	INTRON	
rs10199768	2	21244000	<i>APOB</i>	INTRON	
rs11676704	2	21244358	<i>APOB</i>	INTRON	
rs12720791	2	21244617	<i>APOB</i>	INTRON	
rs7589300	2	21244760	<i>APOB</i>	INTRON	
rs12720804	2	21254997	<i>APOB</i>	INTRON	
rs12720832	2	21256713	<i>APOB</i>	INTRON	

ES 2 490 492 B1

rs12720842	2	21257927	<i>APOB</i>	INTRON	
rs579826	2	21261507	<i>APOB</i>	INTRON	
rs12720796	2	21261998	<i>APOB</i>	INTRON	
rs10205849	2	21262190	<i>APOB</i>	INTRON	
rs12720794	2	21262375	<i>APOB</i>	INTRON	
rs531819	2	21263639	<i>APOB</i>	INTRON	
rs512535	2	21267782	<i>APOB</i>	INTERGENIC	
rs7575840	2	21273490	<i>APOB</i>	INTERGENIC	
rs1267059	2	162018643	<i>TANK</i>	INTRON	
rs5742909	2	204732347	<i>CTLA4</i>	INTERGENIC	
rs231775	2	204732714	<i>CTLA4</i>	CODING	SYNON
rs919178	2	231044464	<i>SP110</i>	INTRON	
rs4571051	2	234091158	<i>INPP5D</i>	INTRON	
rs17740066	3	121100283	<i>STXBP5L</i>	CODING	SYNON
rs12654264	5	74648603	<i>HMGCR</i>	INTRON	
rs2070721	5	131825842	<i>IRF1</i>	INTRON	
rs6880589	5	156460440	<i>HAVCR1</i>	INTRON	
rs953569	5	156477400	<i>HAVCR1</i>	INTRON	
rs1800629	6	31543031	<i>TNF</i>	INTERGENIC	
rs673	6	31543095	<i>TNF</i>	INTERGENIC	
rs3093665	6	31545391	<i>TNF</i>	UTR	
rs1800796	7	22766246	<i>IL6</i>	INTERGENIC	
rs1800795	7	22766645	<i>IL6</i>	INTERGENIC	

ES 2 490 492 B1

rs2069830	7	22767137	<i>IL6</i>	CODING	SYNON
rs13242262	7	128591364	<i>IRF5</i>	INTERGENIC	
rs10488631	7	128594183	<i>IRF5</i>	INTERGENIC	
rs2280714	7	128594725	<i>IRF5</i>	INTERGENIC	
rs328	8	19819724	<i>LPL</i>	CODING	NONSYN
rs1454626	9	2621030	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs7043199	9	2621145	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
Rs 7852400	9	2621482	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
<b>SNP name</b>	<b>Chr</b>	<b>Coordinate</b>	<b>Gene</b>	<b>Location</b>	<b>Coding Status</b>
rs7032549	9	2623615	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs7022122	9	2624186	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs10967213	9	2625172	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs1545566	9	2626031	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs4741747	9	2626654	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs12551418	9	2627365	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs1869592	9	2632250	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs10812379	9	2633548	<i>VLDLR</i>	INTERGENIC	
rs4740698	9	2637551	<i>VLDLR</i>	INTRON	
rs3890182	9	107647655	<i>ABCA1</i>	INTRON	
rs4986791	9	120475602	<i>TLR4</i>	UTR	
rs886277	11	2439767	<i>TRPM5</i>	CODING	NONSYN
rs2298455	11	71710478	<i>IL18BP</i>	INTRON	
rs187238	11	112034988	<i>IL18</i>	INTERGENIC	

ES 2 490 492 B1

rs1946518	11	112035458	<i>IL18</i>	INTERGENIC	
rs2878771	12	50352393	<i>AQP2</i>	UTR	
rs7303577	12	64874102	<i>TBK1</i>	INTRON	
rs1131454	12	113348870	<i>OAS1</i>	COMPLEX	
rs2295977	14	24657226	<i>IPO4</i>	INTRON	
rs1800588	15	58723675	<i>LIPC</i>	INTERGENIC	
rs2290351	15	90374781	<i>AP3S2</i>	UTR	
rs1800775	16	56995236	<i>CETP</i>	INTERGENIC	
rs1529729	19	11163562	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs10415811	19	11177408	<i>LDLR</i>	INTERGENIC	
rs8102273	19	11180047	<i>LDLR</i>	INTERGENIC	
rs9305020	19	11186711	<i>LDLR</i>	INTERGENIC	
rs11672123	19	11194823	<i>LDLR</i>	INTERGENIC	
rs6511720	19	11202306	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs2228671	19	11210912	<i>LDLR</i>	CODING	NONSYN
rs12983082	19	11216561	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs11669576	19	11222300	<i>LDLR</i>	CODING	SYNON
rs1003723	19	11224181	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs5930	19	11224265	<i>LDLR</i>	CODING	NONSYN
rs4508523	19	11226944	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs2738446	19	11227326	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs688	19	11227602	<i>LDLR</i>	CODING	NONSYN
rs2738452	19	11229218	<i>LDLR</i>	INTRON	

ES 2 490 492 B1

rs5925	19	11230881	<i>LDLR</i>	CODING	NONSYN
rs2738456	19	11236804	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs2738457	19	11237269	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs2569540	19	11238239	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs2738459	19	11238473	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs2738460	19	11238807	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs2116898	19	11241810	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs6413504	19	11241915	<i>LDLR</i>	INTRON	
rs14158	19	11242044	<i>LDLR</i>	UTR	
rs3826810	19	11242133	<i>LDLR</i>	UTR	
rs2738464	19	11242307	<i>LDLR</i>	UTR	
rs2738465	19	11242496	<i>LDLR</i>	UTR	
rs1433099	19	11242658	<i>LDLR</i>	UTR	
rs2738466	19	11242765	<i>LDLR</i>	UTR	
rs5742911	19	11243445	<i>LDLR</i>	UTR	
rs7258950	19	11250139	<i>LDLR</i>	INTERGENIC	
rs4804570	19	11256059	<i>LDLR</i>	INTERGENIC	
rs4804146	19	11256176	<i>LDLR</i>	INTERGENIC	
rs28416813	19	39735644	<i>IL28B</i>	INTERGENIC	
rs8099917	19	39743165	<i>IL28B</i>	INTERGENIC	
rs1800471	19	41858876	<i>TGFB1</i>	CODING	NONSYN
rs1800469	19	41860296	<i>TGFB1</i>	INTERGENIC	
rs405509	19	45408836	<i>APOE</i>	INTERGENIC	

rs429358	19	45411941	<i>APOE</i>	CODING	NONSYN
rs7412	19	45412079	<i>APOE</i>	CODING	NONSYN
rs439401	19	45414451	<i>APOC1</i>	INTERGENIC	
rs445925	19	45415640	<i>APOC1</i>	INTERGENIC	
rs4420638	19	45422946	<i>APOC1</i>	INTERGENIC	
rs12104272	19	50148052	<i>SCAF1/IRF3</i>	INTERGENIC	
rs2229207	21	34614250	<i>IFNAR2</i>	CODING	NONSYN
rs2243592	21	34707808	<i>IFNAR1</i>	INTRON	

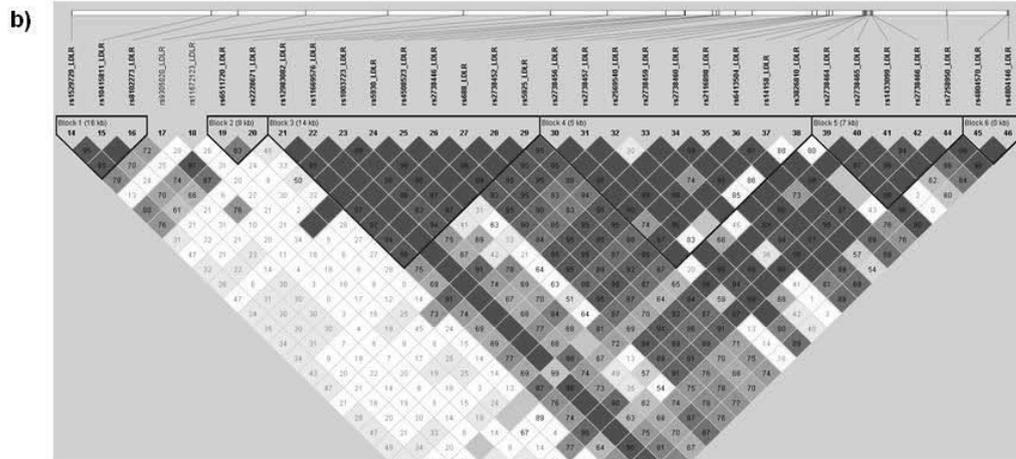
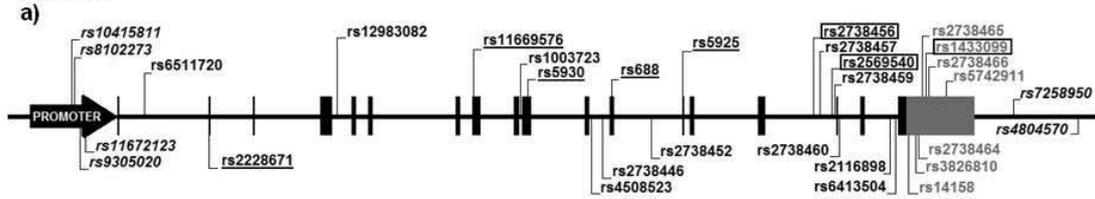
Tabla 2. Frecuencia de los haplotipos mayores (>5%) y carga viral de VHC en pacientes infectas con virus de genotipos 1 y 4

Haplotype	Freq VL>600000	Freq VL<600000	$\chi^2$	P value	SNPs
GACCAAAA	0.26	0.21	1.46	0.22	rs2738456 rs2738457 rs2569540 rs2738459 rs2738460 rs2116898 rs6413504 rs14158
AGCAGGG	0.44	0.35	4.1	0.042	
AGGCGGA	0.11	0.25	15.95	0.00006	
AGGAGGA	0.09	0.06	0.01	0.32	
AGG	0.25	0.21	0.83	0.36	rs2738465 rs1433099 rs2738466
GAA	0.23	0.34	7.77	0.005	
AGA	0.04	0.06	0.64	0.42	
GGA	0.46	0.37	4.25	0.039	
AGGACGA	0.37	0.44	2.6	0.1	rs12983082 rs11669576 rs1003723 rs5930 rs2738446 rs688 rs2738452 rs5925
CGAGGAG	0.45	0.37	3.34	0.067	
AGGGCGA	0.07	0.1	1.51	0.21	
AAGGCGA	0.06	0.05	0.22	0.63	

## REIVINDICACIONES

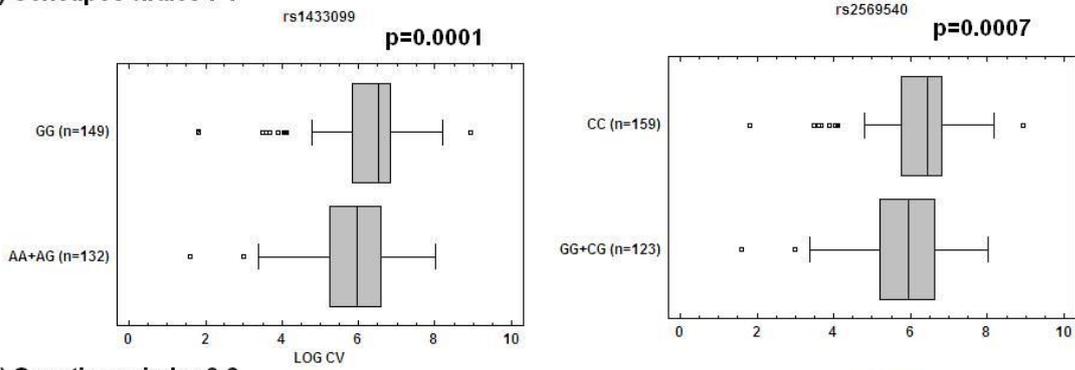
- 5 1.- El uso de los polimorfismos genéticos: rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs1433099 y rs6413504 del gen *LDLR*, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con VHC.
- 2.- El uso de los polimorfismos genéticos del gen *LDLR* según la reivindicación anterior, donde la respuesta al tratamiento es la respuesta virológica sostenida (RVS).
- 10 3.- El uso de los polimorfismos genéticos del gen *LDLR* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el VHC es de los genotipos que se seleccionan de entre: genotipo 1, genotipo 2, genotipo 3, genotipo 4, o cualquiera de sus combinaciones.
- 4.- Un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con VHC, que comprende:
- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- 15 b) detectar los polimorfismos genéticos: rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs1433099 y rs6413504 del gen *LDLR*, en la muestra biológica aislada de (a).
- 5.- El método de obtención de datos útiles según la reivindicación anterior, donde la respuesta al tratamiento es la respuesta virológica sostenida del VHC.
- 20 6.- El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, que además comprende medir la carga viral del VHC en un individuo.
- 7.- El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que además comprende determinar los polimorfismo del gen *IL28B*.
- 25 8.- El método de obtención de datos útiles según la reivindicación anterior, donde los polimorfismo del gen *IL28B* son el rs12979860 y/o rs8099917.
- 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde el VHC es de los genotipos que se seleccionan de entre: genotipo 1, genotipo 2, genotipo 3, genotipo 4, o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, donde la determinación de los polimorfismos se realiza mediante PCR.
- 11.- Un kit o dispositivo que comprende una o varias secuencias nucleotídicas necesarias para detectar los polimorfismos del gen *LDLR*.
- 35 12.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, donde los polimorfismos del gen *LDLR* son rs2738456, rs2738457, rs2569540, rs2738459, rs2738460, rs2116898, rs1433099 y rs6413504.
- 13.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que además comprende una o varias secuencias nucleotídicas necesarias para detectar los polimorfismos del gen *IL28B*.
- 14.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior donde los polimorfismos del gen *IL28B* son el rs12979860 y el rs8099917
- 40 15.- El uso de un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, para predecir o pronosticar la respuesta, en pacientes infectados con VHC, al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina.

Figura 1



**Figura 2**

**a) Genotipos virales 1-4**



**b) Genotipos virales 2-3**

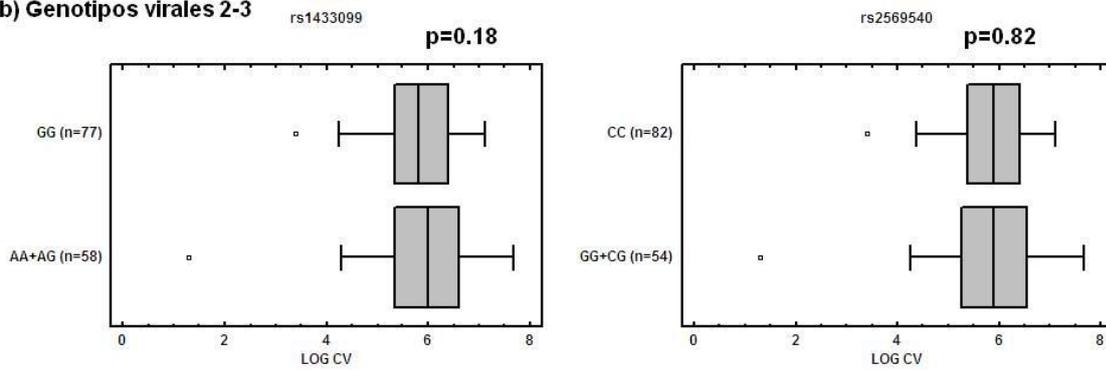


Figura 3

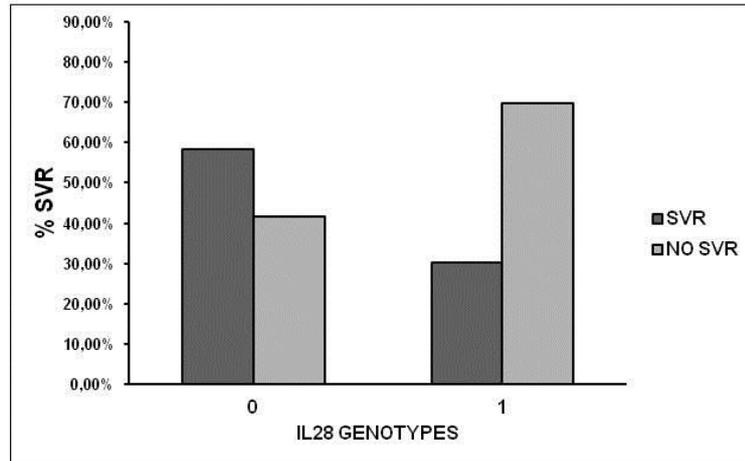
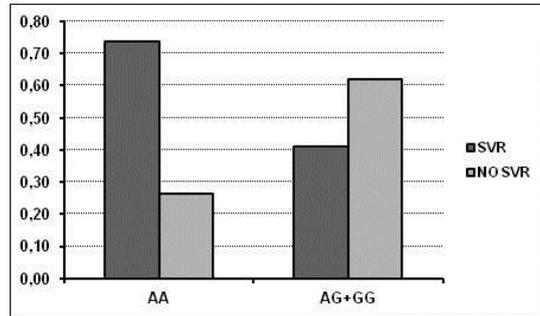


Figura 4

a)



b)

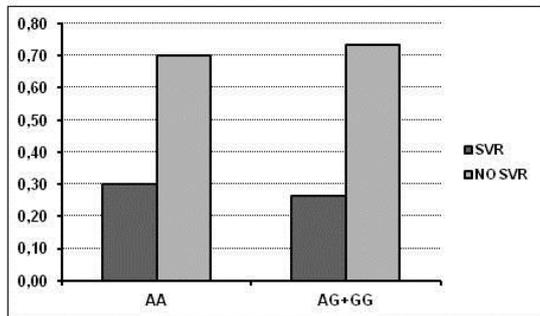


Figure 5:

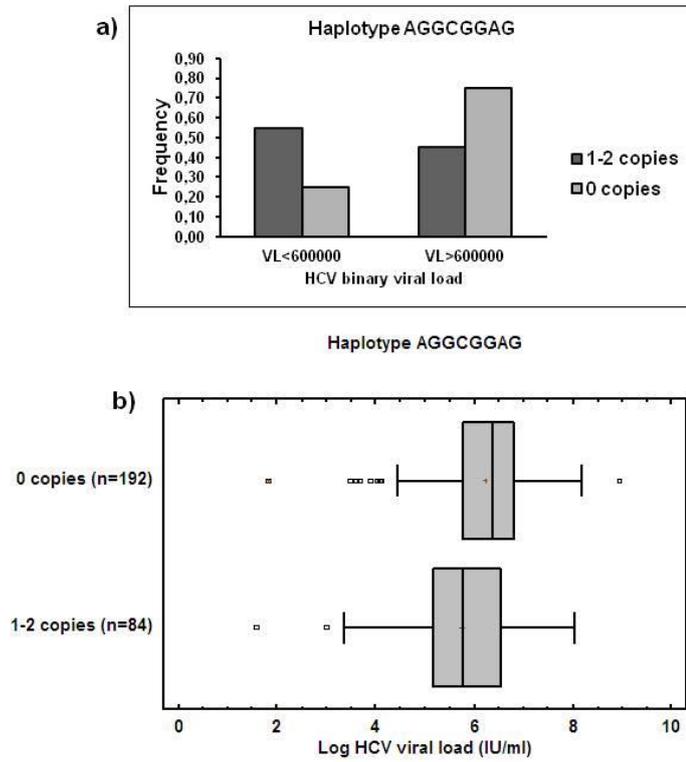


Figura 6: Haplotipo compacto de LDLR y carga viral

a) Con umbral de 600.000 copias,  $p=0.0007$

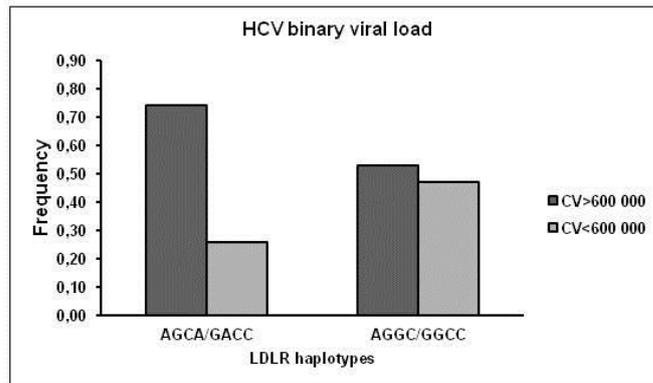


Figura 6

b)

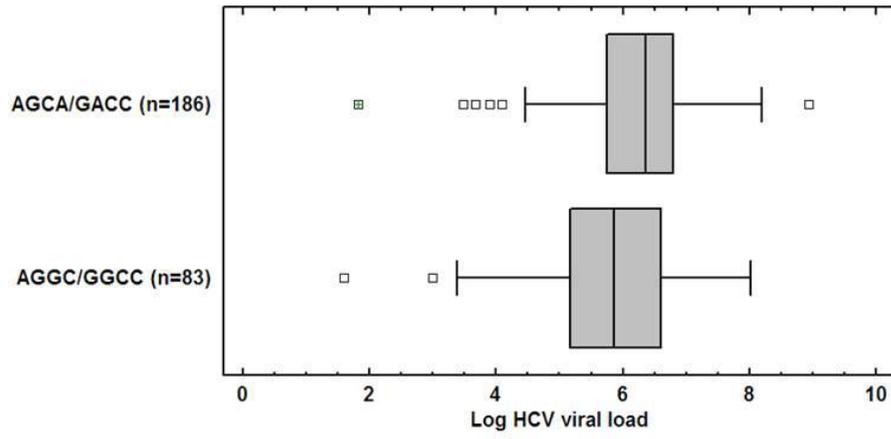
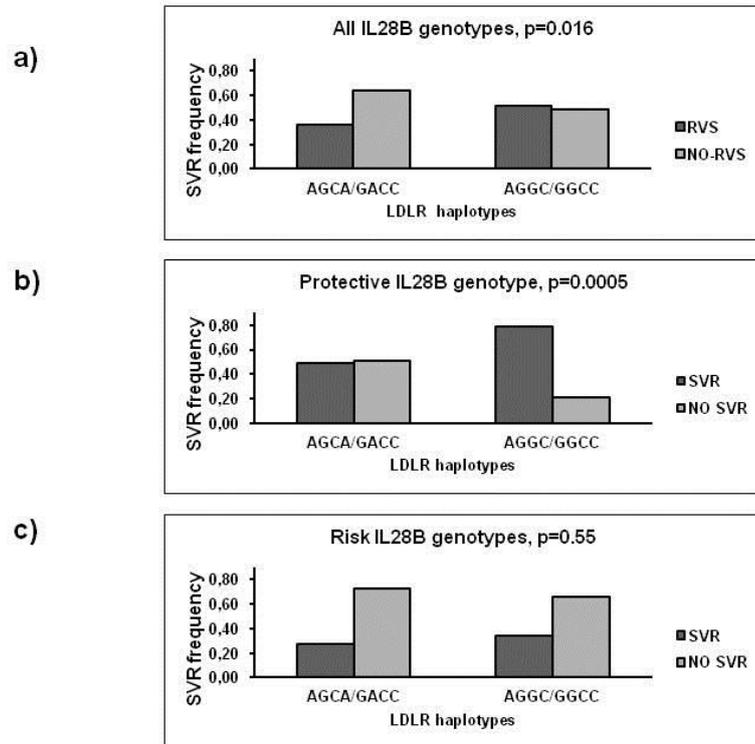


Figure 7:





②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201330294

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 01.03.2013

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HENNIG BJW et al. Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. Genes and Immunity. 2002. Vol 3, páginas: 359-367, todo el documento.	1-15
X	SORIANO et al. Pharmacogenetics of hepatitis C. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012. Vol. 67, páginas: 523-529, todo el documento.	7-10,13-15
A	PINEDA JA et al. Low-density lipoprotein receptor genotyping enhances the predictive value of IL28B genotype in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. AIDS. 2011. Vol. 25(11), páginas: 1415-1420, página 1415, resumen.	1-15
A	PINEDA JA et al. Prediction of Response to Pegylated Interferon plus Ribavirin by IL28B Gene Variation in Patients Coinfected with HIV and Hepatitis C Virus. Clinical Infectious Diseases. 2010. Vol. 51(7), páginas: 788-795, página 788, resumen.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
17.03.2015

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/5

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.03.2015

**Declaración**

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

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HENNIG BJW et al. Genes and Immunity. 2002. Vol 3, páginas: 359-367.	2002
D02	SORIANO et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012. Vol. 67, páginas: 523-529.	2012
D03	PINEDA JA et al. AIDS. 2011. Vol. 25(11), páginas: 1415-1420.	2011
D04	PINEDA JA et al. Clinical Infectious Diseases. 2010. Vol. 51(7), páginas: 788-795.	2010

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

La presente invención divulga un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado (IFN-Peg) más ribavirina (RBV) en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C (VHC). En particular, se reivindica el uso de los siguientes polimorfismos del gen LDLR: *rs2738456*, *rs2738457*, *rs2569540*, *rs2738459*, *rs2738460*, *rs2116898* y *rs6413504* que a su vez pueden ir combinados con los polimorfismos *rs12979860* y/o *rs8099917* del gen IL28B (reivindicaciones 1-15).

El documento D01 divulga un estudio, realizado en pacientes afectados con el virus de la hepatitis C, sobre la asociación de polimorfismos en el gen receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en el desarrollo de infección por virus de la hepatitis C y su respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un estudio sobre la farmacogenética de la hepatitis C y la influencia que tiene la existencia de polimorfismos en los genes IL28B, ITPS y LDLR sobre el desarrollo de la enfermedad y su respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un estudio sobre la relación entre el polimorfismo *rs14158* del gen que codifica para el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en la predicción a la respuesta al tratamiento con interferón pegilado (Peg-IFN) más ribavirina en pacientes coinfectados con virus VIH/VHC. Se refiere también a la interacción entre dicho polimorfismo y otros indicadores de la respuesta vírica como el polimorfismo *rs12979860* del gen IL28B (ver página 1415, resumen).

El documento D04 divulga un estudio sobre la relación entre el polimorfismo *rs12979860* del gen IL28B en la predicción a la respuesta al tratamiento con interferón pegilado (Peg-IFN) más ribavirina en pacientes coinfectados con virus VIH/VHC. En dicho estudio se indica la posible asociación entre el polimorfismo *rs12979860* y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (ver página 788, resumen).

**1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)**

El objeto técnico de la presente invención es un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C. En particular se reivindica el uso de los siguientes polimorfismos genéticos del gen LDLR: *rs2738456*, *rs2738457*, *rs2569540*, *rs2738459*, *rs2738460*, *rs2116898* y *rs6413504*.

**1.1. REIVINDICACIONES 1-15.**

Ninguno de los documentos citados D01-D04 anticipa el uso de los polimorfismos *rs2738456*, *rs2738457*, *rs2569540*, *rs2738459*, *rs2738460*, *rs2116898* y *rs6413504*, del gen LDLR, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D04, las reivindicaciones 1-15 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

## 2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

### 2.1. REIVINDICACIONES 1-15.

El documento D01 anticipa la asociación de polimorfismos en el gen receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en el desarrollo de una infección por virus de la hepatitis C y su respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con dicho virus.

Dada la evidente relación entre polimorfismos del gen LDLR y la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C, se considera que sería obvio para un experto en la materia utilizar polimorfismos de este gen en métodos de diagnóstico y/o pronóstico relacionados con el VHC y sus tratamientos y conseguir los resultados aportados con expectativas razonables de éxito mediante la aplicación de las técnicas habituales de diagnóstico genético.

Por otra parte, el documento D02 anticipa el uso de los polimorfismos *rs12979860* y *rs8099917* del gen IL28B para predecir la respuesta al tratamiento con IFN-Peg en pacientes infectados con VHC, incluso asociados a polimorfismos del gen receptor de lipoproteínas de baja densidad. De este modo, se considera que para un experto en la materia también sería obvia la combinación de polimorfismos de los genes LDLR y IL28B para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-15 no cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D03 y D04, que anticipan el uso de polimorfismos de los genes IL28B y LDLR para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con IFN-Peg más RBV en pacientes coinfectados por VIH/VHC, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación a la novedad y/o actividad inventiva del objeto de la invención.