

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 340**

21 Número de solicitud: 201330522

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.04.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.10.2014

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)

Avda. de la Constitución, 18

41071 Sevilla ES y

UNIVERSIDAD DE HUELVA (50.0%)

72 Inventor/es:

JIMÉNEZ MACÍAS, Fernando Manuel;

RAMOS LORA, Manuel;

SALINAS MARTÍN, Manuel Vicente;

PUJOL DE LA LLAVE, Emilio y

RUIZ FRUTOS, Carlos

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **Método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con biterapia estándar (interferón pegilado + ribavirina) en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1)**

57 Resumen:

Método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con biterapia estándar (interferón pegilado + ribavirina) en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1).

La presente 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 con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1), combinando varios predictores: los niveles de IP-10, cortisol basal, polimorfismo genético de la Interleucina 28B (IL28B), aclaramiento de la creatina, 2 cargas virales (RNA-VHC) y 5 determinaciones de las lipoproteínas: LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos. Además, la presente invención divulga el kit para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1) según se indica en la presente invención y sus diferentes usos.

ES 2 507 340 A1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con biterapia estándar (interferón pegilado + ribavirina) en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1).

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, y 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 con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1), combinando varios predictores: los niveles de IP-10, cortisol basal, polimorfismo genético de la Interleucina 28B (IL28B), aclaramiento de la creatina, 2 cargas virales (RNA-VHC) y 5 determinaciones de las lipoproteínas: LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

A principios del 2012 fue aprobada en nuestro país el empleo de los nuevos antivirales de acción directa (AAD): Boceprevir (Victrelis, MSD) y Telaprevir (Incivo, Janssen-Cilag) en asociación con la biterapia estándar (interferón pegilado + Ribavirina), la cual incrementaba las tasas de curación tanto en pacientes naive (no tratados previamente) como en pacientes no respondedores a terapias previas (recidivantes o relapsers, parciales y nulos o refractarios) en aproximadamente un 25-30 % adicional respecto a la biterapia estándar, tal como se pone de manifiesto en los estudios realizados en pacientes naive (SPRINT-2 y ADVANCE), como en previamente tratados (RESPOND-2 y REALIZE).

El inconveniente que tiene la incorporación de estos fármacos radica en que han sido incorporados en un momento delicado de grave crisis económica global, que obliga a una gestión eficiente de los recursos sanitarios en terapias de alto coste como éstas. Además estos nuevos antivirales son responsables de una mayor tasa de anemia secundaria (que en algunas series puede afectar al 50% de los casos tratados, lo que va a incrementar, a su vez, los costes derivados del uso de Epoetina alfa y un mayor consumo de hemoderivados (mayor necesidad de transfusiones sanguíneas). Además aparecen interacciones farmacológicas y resistencias con el empleo de estos nuevos fármacos que antes no existían cuando usamos la biterapia. Se ha demostrado con los nuevos antivirales unas mejores de tasas de curación en pacientes portadores del genotipo viral 1b cuando los

comparamos con los pacientes portadores de genotipos 1a, los cuales son más difíciles de curar con la triple terapia.

5 Patrones cinéticos virales como la presencia de respuesta virológica rápida (RVR) en los pacientes con genotipo 1 tratados con biterapia antiviral, que aparece en un 8-15%, así como la presencia de la respuesta virológica rápida extendida (RVRe) en pacientes con genotipo 1 tratados con Telaprevir , que son aquellos que logran alcanzar una viremia indetectable tanto a la 4ª como a la 12ª semana, como aquellos que al ser tratados con Boceprevir consiguen alcanzar una viremia indetectable tanto en la semana 8ª como en la 10 24ª, que es conocido como “respondedor precoz”, son respuesta cinéticas que están asociadas a unas tasas de curación virológica o respuesta virológica sostenida (RVS) muy altas, generalmente superiores al 90 %, de forma que en pacientes tratados con biterapia que alcanzan la RVR, el añadir un AAD no aporta ningún beneficio terapéutico, alcanzando, por tanto, una tasa de curación similares, independientemente de que se use la biterapia 15 estándar o la triple terapia.

El polimorfismo genético de la interleucina 28b (IL-28B) fue descubierto en 2009 (Ge *et al.*, 2009. *Nature*, 461(7262), 399-401) como potente predictor de la respuesta a la terapia antiviral en pacientes naive diagnosticados de hepatitis crónica C (HCC), demostrando que 20 los pacientes que tenían un genotipo favorable (CC) se curaban de forma estadísticamente significativa mayor (80%) que aquellos que tenían un genotipo desfavorable de la IL-28B (CT: 40% y TT: 35%).

Estudios previos habían usado dosis mayores de interferón pegilado durante 12 semanas 25 para valorar si alcanzaban mayores tasas de curación, demostrándose que esto no aportaba beneficio, pero sí observaron que la reducción de la viremia respecto a la carga viral basal (CVB) era dosis-dependiente. Partiendo del hecho que el interferón pegilado alfa-2a alcanzaba sus mayores concentraciones plasmáticas a las 72 horas de haber recibido la 1ª dosis de dicho fármaco y que sus efectos desaparecen al 7º día de terapia, partimos de la 30 hipótesis que una dosis de inducción de interferón pegilado (360 µg) podría ser empleada para poner de manifiesto la sensibilidad viral al interferón exógeno durante la 1ª semana de terapia, en función de la reducción virémica alcanzada en 2 momentos distintos: 72 horas y 1ª semana de terapia. La máxima reducción de la viremia alcanzada, bien a las 72 horas o al alcanzar la 1ª semana de terapia, conocida como “RV1”, podría reflejar el grado de 35 sensibilidad viral al interferón pegilado, lo que podría ser empleado en nuestro modelo predictivo para predecir las tasas de RVS. Probablemente los pacientes más difíciles de

curar (aquellos con mayor fibrosis hepática: METAVIR F4 o portadores de una cirrosis hepática), así como aquellos con mayor carga viral basal (> 850000 UI/mL), para alcanzar la curación virológica vayan a precisar durante la primera semana de terapia antiviral una reducciones mayores de la viremia respecto a la carga viral basal que aquellos sujetos portadores de un grado de fibrosis más baja (F0-F3) o inicien la terapia antiviral con una carga viral basal más baja (<850000 UI/mL).

Variables como IP-10 elevada (quimioquina que se libera en procesos inflamatorios, que se ha asociado a la primera fase de reducción virémica correspondiente a la 1ª semana de terapia antiviral) ha sido asociada a menores tasas de curación. Por otra parte, partiendo del hecho de que la Ribavirina, como antiviral empleado en ambos regimenes terapéuticos (dual y triple), presenta una aclaramiento renal, Lindahl elaboró una fórmula para un ajuste pretratamiento personalizado de la dosis de Ribavirina, lo que permitiría una mejor optimización de la dosis diaria de dicho fármaco, dependiendo del grado de aclaramiento de Creatinina y de Ribavirina. Esto es algo que no se ha tenido en cuenta en la práctica clínica, pese a que es un fármaco hoy por hoy totalmente indispensable, independientemente del régimen terapéutico antiviral empleado (dual o triple terapia antiviral). También la resistencia insulínica se ha asociado a bajas tasas de curación (valores de HOMA-IR elevados). Se han publicado estudios en que la asociación de las variables IP-10 y el polimorfismo genético de la IL-28B ha generado modelos predictivos no basado en scores como los que se emplean en la presente invención, que mejoraba su poder pronóstico.

Cuando los pacientes son tratados con biterapia, se producen cambios en el metabolismo de las lipoproteínas, de forma que las LDL-colesterol, HDL-colesterol y nivel de triglicéridos se ven modificados. En concreto, el grado de reducción de la LDL-colesterol durante las primeras semanas, junto con el grado de hipertrigliceridemia producido podría reflejar el grado de actividad de la lipoprotein lipasa, responsable de la conversión de la VLDL segregadas por el hepatocito a IDL y posteriormente a LDL-colesterol, generando un grado distinto de competencia con las lipovirpartículas LDL por los receptores LDL-colesterol hepatocitarios y un grado de competencia mayor o menor por los receptores Scavenger entre las moléculas de VLDL e IDL ricas en triglicéridos y las moléculas HDL-colesterol.

Actualmente no se dispone de modelos predictivos basados en puntuaciones o scores con suficiente valor predictivo negativo y suficientemente específicos que permita suspender la biterapia estándar de forma muy precoz (antes del 1º mes) y oriente en cuanto a la posible duración recomendada de la terapia.

Actualmente sólo se dispone de 2 variables predictivas de respuesta al tratamiento con biterapia estándar en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1): la presencia de respuesta virológica rápida (RVR) y el genotipo favorable (CC) de la interleucina 28b (IL-28B), que aunque tienen un alto valor predictivo positivo (VPP), desafortunadamente no tienen capacidad por sí solas para predecir aquellos pacientes que finalmente no se curarán con biterapia estándar. No existen escalas basadas en puntuaciones que discrimine los pacientes que realmente no van a poderse curar.

En la presente invención se elabora por primera vez una escala predictiva de respuesta al tratamiento antiviral para pacientes con hepatitis crónica VHC genotipo 1 basada en las puntuaciones de 3 escalas predictivas obtenidas en 3 momentos distintos de tratamiento, que discrimina qué pacientes se curarán con la biterapia estándar (interferón pegilado + ribavirina) y cuáles se recomienda que ésta se suspenda, evitando costes innecesarios, efectos secundarios y permitiéndoles iniciar la triple terapia.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1), combinando varios predictores: los niveles de IP-10, cortisol basales, polimorfismo genético de la Interleucina 28B (IL28B), aclaramiento de la creatina, 2 cargas virales (RNA-VHC) y 5 determinaciones de las lipoproteínas: LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante "primer método de la invención", de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1), que comprende:

a) obtener muestras biológicas aisladas de un individuo a distintos tiempos T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4 , donde T_0 = inicio, T_1 = 3 días, T_2 = 7 días, T_3 = 14 días y T_4 = 30 días desde el inicio del tratamiento con interferón pegilado más ribavirina

b) identificar a T_0 :

(i) la IP-10 sérica (pg/mL),

(ii) el genotipo de IL-28 (CC, CT y TT),

(iii) el cortisol sérico ($\mu\text{g/dl}$)

(iv) el aclaramiento de la creatina (mL/hora),

35

- a T_0, T_1, T_2 :

(v) la carga viral (\log_{10} UI/mL),

- a T_0, T_1, T_2, T_3 y T_4

(vi) valor medio de LDL-c durante el primer mes, tomado a T_0, T_1, T_2, T_3 y T_4

5 **(vii)** grado de fibrosis hepática

(viii) valor del ratio de infectividad, que se considera como el cociente entre la concentración de LDL-colesterol media durante 1º mes de terapia y la concentración media de HDL-colesterol durante este periodo.

10 En una realización preferida de este aspecto, el primer método de la invención comprende asignar puntuaciones según los valores de los marcadores a los distintos tiempos, donde:

(i) si la IP-10 < 409,9 pg/mL, se le asignan +2 puntos; si la IP-10 = 410-599 pg/mL, se le asigna -1 punto; si la IP-10 > 600 pg/mL se le asigna -2 puntos.

15 **(ii)** si el genotipo de IL-28B es CC se le asignan +2 puntos; si el genotipo de IL-28B es CT o TT se le asigna -1 puntos.

(iii) si el cortisol sérico < 12,9 µg/dl se le asignan + 2 puntos; si el cortisol sérico = 13-17,9 µg/dl se le asigna -1 punto; si el cortisol sérico > 18 µg/dl se le asignan -2 puntos.

20 **(iv)** si el aclaramiento de la creatinina es < 115,9 mL/hora se le asignan + 2 puntos; si el aclaramiento de la creatinina es = 116-139 mL/hora se le asignan -2 puntos; si el aclaramiento de la creatinina es > 140 mL/hora se le asignan -4 puntos.

25 **(v)** si la carga viral basal es muy alta > 6×10^6 UI/mL y si RV1 < 2,5 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan - 5 puntos; si la carga viral basal es muy alta > 6×10^6 UI/mL y si RV1 \geq 2,5 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan +5 puntos; si carga viral basal es alta = 5999999-3000000 UI/mL o si F4 (Cirrosis) y si RV1 < 1,4 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan - 5 puntos; si carga viral basal alta = 5999999-3000000 UI/mL o si F4 (Cirrosis) y si RV1 \geq 1,4 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan + 5 puntos; si carga viral basal es media = 2999999-850000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si RV1 < 1,2 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan - 4 puntos; si carga viral basal es media = 2999999-850000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si RV1 \geq 1,2 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan + 4 puntos; si carga viral basal es baja = 849999-100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si RV1 < 0,8 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan - 4 puntos; si carga viral basal es baja = 849999-100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si RV1 \geq 0,8 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan +4 puntos; si carga viral basal es muy baja < 100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si RV1 < 0,5 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal, se le asignan

35

- 4 puntos; si carga viral basal es muy baja < 100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si $RV1 \geq 0,5 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan +4 puntos.

(vi) si existe cirrosis (F4) y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) e independientemente de la carga viral basal o si no existe cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y carga viral basal muy alta (≥ 3000000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 110 mg/dl se le asignan +4 puntos; si existe cirrosis (F4) y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) e independientemente de la carga viral basal o si no existe cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y carga viral basal muy alta (≥ 3000000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 110 mg/dl se le asignan -4 puntos; si existe cirrosis (F4) y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal (< 3000000 UI/mL) o si no existe cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal muy alta (≥ 3000000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 105 mg/dl se le asignan +4 puntos; si cirrosis (F4) y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal (< 3000000 UI/mL) o si no existe cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal muy alta (≥ 3000000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 105 mg/dl se le asignan -4 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y carga viral basal alta o baja (2999999-100000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 80 mg/dl se le asignan +3 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y carga viral basal alta o baja (2999999-100000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 80 mg/dl se le asignan -3 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal alta o baja (2999999-100000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 65 mg/dl se le asignan +3 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal alta o baja (2999999-100000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 65 mg/dl se le asignan -3 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal muy baja (< 100000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 45 mg/dl se le asignan +2 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal muy baja (< 100000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 45 mg/dl se le asignan -2 puntos.

En una realización preferida de este aspecto, el primer método de la invención además comprende:

35

c) predecir a la semana del inicio del tratamiento la respuesta viral sostenida del individuo del paso (a) según el índice, aquí (en la presente invención) llamado Onuba Week:

5
$$\text{Week} = i + ii + iii + iv + v$$

d) y predecir al mes del inicio del tratamiento la respuesta viral sostenida del individuo del paso (a) según el índice, aquí (en la presente invención) llamado Onuba-Month:

10
$$\text{Month} = i + ii + iii + iv + v + vi$$

En una realización preferida del método, si Week está comprendido entre -4 y -18 puntos se recomienda suspender la biterapia y se recomienda iniciar la triple terapia; si la suma está
15 comprendida entre -3 y +18 se recomienda mantener la terapia hasta finalizar el primer mes y adicionar la siguiente puntuación Month.

En otra realización preferida del método si Month está comprendido entre +1 y +17 puntos se debe mantener la terapia antiviral; si la suma está comprendida entre 0 y -18 se debe
20 suspender la biterapia e iniciar la triple la terapia antiviral.

A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación tal y como es
25 entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la
30 determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de
35 p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el

60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

- 5 Actualmente existen dos tipos de interferón pegilado comerciales cuya aplicación se ha extendido: peginterferón alfa-2a (Pegasys®, Roche) y peginterferón alfa-2b (Pegintron®, Schering-Plough). Estos dos productos son bastante parecidos con respecto a su eficacia y seguridad pero sus regímenes de dosificación difieren levemente.
- 10 La ribavirina 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 los virus.

Actualmente existen dos preparados orales de ribavirina autorizados para tratar la hepatitis C crónica en adultos: Copegus® (Roche) y Rebetol® (Schering-Plough). 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.

- 20 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
- 25 genotipos 4 predomina en Egipto, 5 se da casi exclusivamente en África y genotipo 6 en el sudeste asiático.

El genotipo tiene importancia clínica ya que determina la respuesta potencial de la terapia actual y la duración que va a requerir la misma. Los genotipos 1 y 4 responden menos a dicho tratamiento que los otros (genotipos 2, 3, 5 y 6). La duración de la terapia estándar basada en el interferón para los genotipos 1 y 4 es de 48-72 semanas, mientras que para los genotipos 2 y 3 es solo de 12-24 semanas. En resumen, algunos genotipos del VHC, tales como los tipos 2 y 3, son más fáciles de erradicar que el tipo 1.

Se denomina “carga viral plasmática basal de ARN del VHC”, a la cantidad de ARN del VHC en la sangre (suero). Su presencia es indicativa de una infección activa con reproducción viral en curso. La carga viral suele expresarse en unidades logarítmicas [\log_{10} UI/mL].

5 El genotipo IL28B se puede obtener secuenciando el gen completo. Preferiblemente, se obtiene analizando el polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) rs12979860 (SEQ ID NO: 1) situado en el cromosoma 19, en las proximidades del gen de la interleuquina 28B (IL28B).

10 La secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1 es:

CTGAACCAGGGAGCTCCCCGAAGGCG[C/T]GAACCAGGGTTGAATTGCACTCCGC

El “genotipo del LDLR, se puede obtener también secuenciando el gen completo o usando distintos SNP. En esta invención se obtiene analizando el SNP rs14158 (SEQ ID NO: 2),
15 situado en el cromosoma 19, a nivel del 3’ UTR del gen de LDLR.

La secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 2 es:

CCCAGAACCCTTCCTGAGACCTCGCC[A/C/G/T]GCCTTGTTTTATTCAAAGACAGAGA

20 Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada comprende células de sangre periférica (*peripheral blood cells* PBCs).

25 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.

30 El término “cebador” representa una secuencia oligonucleotídica específica que es complementaria a una secuencia nucleotídica diana y que se usa para hibridarla a la secuencia nucleotídica diana. Un cebador sirve como un punto de iniciación para la polimerización nucleotídica catalizada mediante ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa.

35

El término "haplotipo" se refiere a una combinación de alelos presente en un individuo o una muestra. En el contexto de la presente invención, un haplotipo se refiere preferentemente a una combinación de alelos polimórficos encontrados en un individuo dado y que pueden estar asociados con un fenotipo.

5

El término "polimorfismo", como se usa aquí, se refiere a la aparición de dos o más secuencias genómicas alternativas o alelos entre diferentes genomas o individuos. "Polimórfico" se refiere a la condición en la que dos o más variantes de una secuencia genómica específica se pueden encontrar en una población. Un "sitio polimórfico" es el locus en el que se produce una variación. Un "polimorfismo de un solo nucleótido" (SNP) es un cambio de un solo par de bases. Típicamente, un polimorfismo de un solo nucleótido es la sustitución de un nucleótido por otro nucleótido en el sitio polimórfico. La supresión de un nucleótido individual, o la inserción de un nucleótido individual, también da lugar a polimorfismos de un solo nucleótido.

10

Variante nucleica se entenderá que significa todas las secuencias nucleicas alternativas que pueden existir de forma natural, en particular en seres humanos, y que corresponden en particular a supresiones, sustituciones y/o adiciones de nucleótidos.

15

Como se usa aquí de forma intercambiable, las expresiones "oligonucleótidos", "ácidos nucleicos" y "polinucleótidos" incluyen secuencias de ARN, ADN, o secuencias híbridas de ARN/ADN de más de un nucleótido en forma de cadena sencilla o de dúplex.

20

Como se usa aquí, la expresión "ácidos nucleicos" y "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos nucleotídicos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. En toda la presente memoria descriptiva, la expresión "secuencia nucleotídica" se puede emplear para designar indiferentemente un polinucleótido o un ácido nucleico. Más precisamente, la expresión "secuencia nucleotídica" engloba el propio material nucleico, y de este modo no está restringida a la información de secuencia (es decir, la sucesión de letras escogidas entre las cuatro letras de las bases) que caracteriza bioquímicamente una molécula de ADN o ARN específica. También, aquí se usan de forma intercambiable las expresiones "ácidos nucleicos", "oligonucleótidos" y "polinucleótidos".

25

30

KIT DE DIAGNÓSTICO Y USOS

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado + ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1), que comprende los elementos necesarios para detectar:

- 5 (i) la IP-10 sérica
- (ii) el genotipo de IL-28
- (iii) el cortisol sérico
- (iv) el aclaramiento de la creatina
- 10 (v) la carga viral
- (vi) valor de LDL-c, HDL-c y triglicéridos
- (vii) grado de fibrosis hepática

Para la recogida de muestras biológicas se emplearon los siguientes vacutainers (tubo de ensayo diseñado para venopunción):

- 1. Vacutainer con gelosa de 8,5 mL para determinación de la carga viral VHC, insulina, cortisol, lipoproteínas (bioquímica) e IP-10.
- 2. Vacutainer con EDTA de 4,0 mL para la determinación de las concentraciones plasmáticas de Ribavirina y hemograma.
- 20 3. Vacutainer con citrato de 2,7 mL para la determinación de la coagulación.

Fue empleado los siguientes aparatos:

- 1. Un congelador Sanyo Ultra Low del área de Inmunología/serología para guardar alícuotas de carga viral, IP-10 y ribavirina, a -70°C;
- 2. Una centrífugadora Heraeus Multifugo 3L, de ThermoElectron Corporation;
- 25 3. Congelador para guardar las alícuotas para determinación de insulina y cortisol, a -20°C;
- 4. Cobas c711, de Roche Diagnostic, para determinación de pruebas bioquímicas en suero, mediante técnicas colorimétricas y enzimáticas;
- 5. Test de gestación cualitativo CerTest hCG s& uCard, de Biotec, mediante prueba inmunocromatográfica de un solo paso.

30 Una vez recepcionada las muestras siguieron los siguientes pasos:

1) se procedió a la centrifugación de aquellas muestras de las que era necesario la separación de suero o plasma para la determinación analítica (carga viral de VHC, proteína IP-10, concentración en suero de IP-10, bioquímica, coagulación), en centrífuga Heraeus Multifugo 3L de Thermo Electron Corporation, a 3500 rpm durante 10 minutos.

2) Tras la centrifugación se enviaron a las correspondientes áreas de trabajo para su procesamiento.

3) Para las determinaciones bioquímicas, cortisol e insulina se realizan alícuotas mediante el sistema MPA (Modular Preanalytic), sistema automático para alicuotado y distribución de las muestras. En el caso de la insulina o cortisol cuando no se pudo procesar en el momento de la recepción se congeló la alícuota a -20°C en congelador del área de Automatización.

En los casos de las pruebas analíticas de carga viral de VHC, concentración en suero de IP-10 y concentración plasmática de ribavirina se guardó una alícuota de cada una de ellas congelada a -70 °C en contenedores de propileno de 1,5 mL que se identificaron mediante etiqueta con el nº del código de barras del Laboratorio que se le asignó al volante de petición y muestra correspondiente. Dichas alícuotas se guardaron en gradillas de 10x10 con etiquetas identificativas en el congelador localizado en el área de Inmunología/Serología.

En una realización preferida, la IP-10 sérica basal o pretratamiento se determina mediante el kit humano Quantikine IP-10/CXCL10/IP-10, basado en enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Vitro SA). El rango establecido para esta variable se encuentra comprendido entre 8-624 pg/mL. Triturus, de Grifols, para determinación de la concentración en suero de IP-10 mediante técnica de ELISA con kit de Vitro SA.

En otra realización más preferida, el genotipo de IL-28 se determina mediante el kit comercial LightMix® Kit IL28B de Roche Diagnostics usando LightCycler ® 1.x/2.0/480/480II/Z480. El marcador polimórfico IL28B rs12979860 se analizó utilizando un kit discriminación alélica ABI Taqman con un Sistema de Detección de Secuencia ABI7900HT (Applied Biosciences Hispania, Alcobendas, Madrid, España; Ge et al., 2009. Nature, 461(7262), 399-401) La detección se llevó a cabo por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real con un termociclador Eppendorf Realplex y el uso de sondas fluorescentes.

En otra realización preferida, el cortisol sérico se determina mediante inmunoensayo basado en la electroquimioluminiscencia (Elecsys MODULAR ANALYTICS E170, Roche, Basilea, Suiza). El rango de medición de cortisol era 0,018-63,4 µg/dl. Se empleó Immulite 2000, de Siemens, para determinación de cortisol mediante ensayo inmunométrico con dos sitios de unión, quimioluminiscente en fase sólida.

En otra realización preferida, el aclaramiento de la creatina se determina mediante la fórmula estandarizada: Aclaramiento de creatinina (mL/hora) para (sexo masculino) = $(140 - \text{edad}) \times \text{peso} / 72 \times \text{creatinina sérica basal (mg/dL)}$ y para la (sexo femenino) = $(140 - \text{edad}) \times \text{peso} \times 0,85 / 72 \times \text{creatinina sérica basal (mg/dL)}$. Esta fórmula está disponible en la página web de la Sociedad Española de Nefrología (www.sen.es).

En otra realización preferida, la carga viral se determina mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) (Cobas AmpliPrep / Cobas Taqman, para la determinación de la carga viral del VHC; límite de detección, 15 UI/mL; Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

En otra realización preferida, el valor de LDL-c, HDL-c y triglicéridos se determina tras un ayuno de 14 horas. Los niveles basales y medios de colesterol total y de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol), triglicéridos y VLDL durante el 1º mes de terapia antiviral fueron determinados usando métodos enzimático-calorimétricos (Roche Diagnostics), usando tubos Vacutainer con EDTA. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) se calcularon por la fórmula de Friedewald (Friedewald et al., 1972. Clin. Chem. 18, 499 – 502).

En otra realización preferida, el grado de fibrosis hepática se determina mediante la realización de una biopsia hepática percutánea obtenida en los 6 meses previos a la fecha de inicio de la terapia antiviral. El espécimen obtenido tenía que ser un cilindro de material histológico de al menos 1,5 cm y con presencia de al menos 8 tractos portales para su estudio histopatológico. En la determinación del grado de fibrosis hepática participaron 2 anatómo-patólogos experimentados, quienes establecían el score de METAVIR que le correspondía a las muestras analizadas (F0, F1, F2, F3 y F4). Además valoraban el grado de necro-inflamación histológica presente siguiendo la gradación METAVIR (A0-A3) y el grado de esteatosis hepática, estableciendo ausencia de esteatosis si existía ausencia de vacuolas lipídicas, esteatosis hepática leve si la presencia de vacuolas lipídicas afectaba a <30% de los hepatocitos y severa-moderada si afectaba a $\geq 30\%$ de los hepatocitos del espécimen.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Figura 1:** En esta figura se establecen las curvas ROC y áreas bajo la curva de las diferentes variables que mostraron significancia estadística en los modelos resultantes del análisis de regresión logística multivariante del modelo predictivo elaborado. Del modelo 1 derivan las siguientes variables: a) la concordancia virolipídica (presencia en un mismo paciente de ambas respuesta cinéticas, la respuesta virológica de la primera semana o RVPS y la presencia de un Metabolismo Lipídico Favorable o MLF), la cual presentó un Área bajo la curva (AUROC) de 91%; b) el cortisol sérico basal, una AUROC del 67%; el aclaramiento de creatinina y ribavirina basal, una AUROC del 73%; y la máxima reducción de la viremia durante la 1ª semana de terapia (RV1), cinética viral en la que está basada la Respuesta Virológica de la Primera Semana (RVPS), la cual tuvo una AUROC del 84,4%.

15 Del modelo multivariante 2, además de compartir con el modelo multivariante resultante 1, variables como cortisol basal plasmático y aclaramiento de creatinina basal, también se registran en la curva ROC, variables tales como: a) IP-10 plasmática basal, que presentó una AUROC del 80%; b) Mantenimiento del "Nivel de Exigencia Lipídica" requerido para el grado de fibrosis hepática, carga viral basal y el valor del ratio de infectividad de cada paciente, es decir, que el paciente consiga mantener la concentración plasmática media mínima exigida de lipoproteína de baja densidad (LDL-colesterol) durante el 1º mes de terapia para el Nivel de Exigencia Lipídica al que pertenece dicho paciente, de los 5 niveles que definimos para nuestro estudio. La AUROC que tenía si el paciente mantenía el nivel de exigencia lipídica fue del 71%; c) el genotipo de la Interleucina 28b presentó una AUROC del

20 80%; las concentraciones plasmáticas medias de LDL-colesterol durante el 1º mes de terapia fue 65%; y finalmente si el paciente alcanzaba el Nivel de Exigencia Fibro-virológica exigida para su grado de fibrosis hepática y carga viral basal, es decir, presentaba al menos la reducción máxima de la viremia respecto la basal (RV1) exigida, la curva ROC tuvo un AUROC de un 67%.

35

Figura 2. Los pacientes que mantuvieron unas concentraciones plasmáticas media de LDL-colesterol durante el 1º mes de terapia antiviral se curaron más de forma estadísticamente significativa que aquellos que tuvieron niveles medios más bajos.

5 **Figura 3.** Correlación entre VLDL basal y el valor del ratio de infectividad durante el 1º mes de terapia de los pacientes tratados. Los pacientes que tuvieron niveles basales de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) mayores presentaron valores más elevados del ratio de infectividad.

10 **Figura 4.** Diagrama de flujo de pacientes

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

15

Pacientes y métodos (más información en el diagrama de flujo de pacientes: figura 4)

20 Criterios de inclusión: 103 pacientes diagnosticados de hepatitis crónica C genotipo 1, con biopsia hepática, en la que se registró el grado de fibrosis hepática (Metavir F0-F4), grado de esteatosis hepática (ausencia, leve, moderada-severa) y grado de inflamación histológica (Metavir A0-A3).

25 Criterios de exclusión: 70 pacientes. Diseño del estudio: estudio prospectivo, randomizado, usando una 1ª dosis de inducción de 360 µg de interferón pegilado (Grupo A) frente a una 1ª dosis estándar (180 µg: Grupo B), doble ciego, controlado con placebo enmascarado. La secuencia de randomización fue creada usando el programa Stata 12.0 (StataCorp, College Station): 1:2, de forma que 52 pacientes fueron aleatorizados a recibir la dosis de inducción frente a 51 pacientes que recibieron la dosis estándar. A partir de la 2ª semana, los pacientes recibirían la dosis estándar en ambos grupos. La Ribavirina se administró desde el 30 1ª día de terapia según peso (1000 mg/día si peso < 75 Kg o 1200 mg/día si peso ≥ 75 kg). Los pacientes que tuvieron una anemia sintomática pudieron ser tratados a criterio del investigador de 2 formas posibles: a) una dosis semanal de Epoetina alfa de 40000 UI/sc hasta que el paciente alcanzara un nivel de hemoglobina mayor o igual a 12 g/dl, o bien b) reducción de la dosis de ribavirina de forma progresiva en escalones de 200 mg. Hubo 14 35 pacientes de los 99, que fueron tratados con Epoetina alfa, siendo la duración total en semanas de empleo de este fármaco de $29,2 \pm 13$ semanas.

Los pacientes que presentaron neutropenia y/o leucopenia asociada o no a fiebre pudieron ser tratados de 2 formas: a) empleo semanal de Filgastrim, que fue empleado en 6 pacientes, o bien b) reducción de la dosis de interferón pegilado de forma escalonada (primero 135 µg /semana y posteriormente 90 µg/semana).

5

El estudio se realizó respetando las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki y con la aprobación y seguimiento del Comité Ético Local y Regional. Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado general y el específico generado para estudio genético (polimorfismo genético de la IL-28B).

10

Se realizó el genotipado viral mediante Inno-LiPA HCV II (Immunogenetics NV, Ghent, Belgium). Las carga virales se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Cobas Amplipred/Cobas Taqman HCV test, límite detección 15 UI/mL (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Se determinaron 8 cargas virales por paciente durante el estudio: momento basal, 3º y 7º día (para valorar la máxima reducción de la viremia durante la 1ª semana de terapia: RV1), 4ª semana (valorar incidencia de RVR), 3º mes (presencia de respuesta virológica precoz), 6º mes (viremia detetable o no), fin de tratamiento (11 meses o 48 semanas), 6º mes post-tratamiento (valorar si alcanzó RVS).

15

20 El objetivo principal de estudio fue diseñar un modelo predictivo de respuesta basado en las variables basales significativas en el análisis multivariante, cinética viral de la 1ª semana (presencia o no de la RVPS) y finalmente la cinética lipídica durante el 1º mes, dependiendo de nivel medio de las lipoproteínas (LDL-colesterol media durante el 1º mes de terapia y el valor del ratio de infectividad = cociente entre LDL-colesterol media durante 1º mes de terapia y la concentración media de HDL-colesterol durante este periodo).

25

Así establecimos diferentes niveles de exigencia fibro-virológica (NEFV) con diferentes valores de RV1 necesarios para que el paciente alcanzara la Respuesta Virológica de la Primera Semana (RVPS):

30

1. Si el paciente tenía una carga viral basal > 3 millones de UI/mL, el valor de RV1 que se exigiría en nuestro modelo para alcanzar la RVPS sería de al menos una reducción mínima de 2,5 log respecto a la basal, independientemente de que fuese usada o no la dosis de inducción.

35

2. Si, por el contrario, nuestro paciente tenía cirrosis hepática (F4) y/o una carga viral basal (CVB entre 3 millones UI/mL y 850000 UI/mL), la reducción mínima necesaria durante la 1ª

semana de terapia (RV1) debería ser al menos 1,4 log si se empleaba dosis de inducción y de 1,2 log si era empleada la dosis estándar.

3. Los pacientes no cirróticos (F0-F3) y/o con carga viral baja (entre 850000 UI/mL y > 100000 UI/mL) deberían tener un valor de RV1 de al menos 0,8 log, independientemente de usar o no la dosis de inducción.

4. Los pacientes no cirróticos (F0-F3) con carga viral muy baja (<100000 UI/mL) deberían alcanzar una reducción de la viremia respecto a la basal (RV1) de al menos 0,5 log, para poder alcanzar la RVPS, independientemente de que sea usada la dosis de inducción o no.

Por otra parte, además de esta hipótesis cinética viral quisimos demostrar que la cinética lipídica durante el 1º mes de terapia podía condicionar la tasas de curación virológica, algo que podría estar relacionado con los niveles medios de LDL-colesterol, de forma que el valor medio de esta lipoproteína (mLDLc) necesario para que el paciente tuviera un metabolismo lipídico favorable podría ser distinto dependiendo del grado de fibrosis hepática, carga viral basal y el ratio de infectividad generado, reflejando así la presencia posible de diferentes niveles de exigencia lipídica (NEL). Hablaremos de ratio de infectividad elevado, aquellos que tenga un valor $\geq 3,2$ y que podría estar asociadas a peores tasas de curación, al presentar mayores niveles medio de triglicéridos. Los puntos de corte establecidos para el nivel medio de concentraciones plasmáticas de LDL-colesterol durante el 1º mes de terapia (mLDLc) fueron 5: NEL 5 (110 mg/dl), NEL 4 (105 mg/dl), NEL 3 (80 mg/dl), NEL 2 (65 mg/dl) y NEL 1 (45 mg/dl). Para determinar el valor medio de las lipoproteínas se determinaron en 5 momentos: basal, 3º y 7º día, 2ª y 4ª semana.

Quisimos así, validar un novedoso modelo predictivo de respuesta, el cual estaría basado en las puntuaciones de una escala pronóstica que denominamos en la presente memoria "Escala Onuba", que a su vez estaba estructurada en sobre 3 momentos distintos de la terapia antiviral:

1º Puntuación: Escala Onuba BASAL (EOB), que usaría sólo las variables basales estadísticamente significativas en el análisis multivariante.

2ª Puntuación: Escala Onuba-Week (EOW): la cual era obtenida al finalizar la 1ª semana de terapia antiviral, incrementando o reduciendo el score de la escala previa basal, puntuación que dependía de que el paciente alcanzara o no el valor necesario RV1 de reducción de la

viremia respecto a la carga viral basal durante la 1ª semana de tratamiento (presencia o no de la Respuesta Viroológica de la 1ª Semana o RVPS). Los pacientes que hubieran obtenido una puntuación muy negativa tras el cálculo del score de ambas escalas, podrían ser candidatos a suspender la terapia al finalizar la 1ª semana, por muy escasas probabilidades de alcanzar la curación virológica o RVS, pudiendo ser considerado dicho paciente para el inicio de la triple terapia, con una información muy privilegiada.

3ª Puntuación: Escala Onuba-Month (EOM): calculada al finalizar la 4º semana de terapia, dependiendo de si el paciente presentaba o no un “Metabolismo Lipídico Favorable”.

10

La cuantificación de los niveles de IP-10 basal fueron medidos mediante el kit “Quantikine humano CXCL10/IP-10 mediante inmunoensayo (RD systems). El rango de IP-10 fue estaba comprendido entre 8-624 pg/mL.

15 El polimorfismo genético de la Interleucina 28b (SNP 12979860) fue analizado usando un kit ABI Taqman y un sistema de detección ABI7900HT (Applied Biosciences Hispania, Alcobendas, Madrid, España; Ge *et al.*, 2009. *Nature*, 461(7262), 399-401), Su determinación se realizó mediante PCR en tiempo real con un termociclador Eppendorf RealPlex (sondas fluorescentes).

20

También fueron determinadas variables como HOMA-IR y el cortisol sérico basal mediante electroquimioluminiscencia (Elecsys Modular E170; Roche, Basil, Suiza). El rango de cortisol estaba comprendido entre 0,018-63,4 µg /dl y para el de insulina 0,2-1000 mcU/mL. El aclaramiento de creatinina fue determinado usando la fórmula disponible en la página web de la Sociedad Española de Nefrología.

25

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Estudio randomizado, a doble ciego, prospectivo, el cual incluyó a 103 pacientes, de los cuales finalmente fueron analizados 99 pacientes. El cálculo del tamaño mínimo muestral se realizó mediante el programa nQuery Advisor versión 7.0, el cual estableció 49 pacientes para cada grupo terapéutico: error alfa (tipo I) de 0,5 y error beta de 0,20.

Las variables continuas fueron expresadas como media±desviación estándar, usando el test de Kolmogorov-Smirnov para conocer si las variables analizadas seguían un patrón de normalidad. Las variables categóricas fue registrada en forma de %. Las comparaciones

35

entre grupos terapéuticos se realizó mediante el test de Student's o U de Mann-Whitney para las variables continuas y el test de Chi-cuadrado o test exacto de Fisher para variables categóricas. Valores $p < 0,05$ serían considerados estadísticamente significativas. Para analizar 2 variables continuas se empleó el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis de regresión logística multivariante fue empleado para identificar aquellas variables estadísticamente asociadas a las tasas de RVS. Las variables que fueron encontradas significativamente asociadas con la variable dependiente en el análisis univariante sería seleccionadas para el análisis de regresión logística multivariante como primer escalón, siendo excluidas aquellos factores que tuvieran un valor de $p > 0,10$.

10

Posteriormente estas variables serían usadas para construir las curvas ROC correspondientes y sus correspondientes áreas bajo la curva (AUROC). Los pacientes fueron incluidos en una base de datos, cumpliendo en todo momento la ley de protección de datos, siendo analizadas usando el paquete estadístico SPSS versión 18.0, SPSS, Chicago, IL.

15

RESULTADOS

1.- Características basales (ver tabla 1).

20

Se analizaron 99 pacientes con HCC-1, mostrándose la distribución de las variables basales o pretratamiento y su relación con el genotipo *IL-28B*, destacando aquellas variables estadísticamente significativas. Las tasas de genotipo desfavorable *IL-28B* fue 61,6%, siendo CT (51,5%) y TT (10,5%).

25

Previo al tratamiento, los genotipos CC tenían mayor grado de inflamación METAVIR que los genotipos desfavorables. Éstos últimos tuvieron mayor tasa de esteatosis hepática, así como mayor grado de severidad de la misma. Los sujetos con genotipo desfavorable (CT/TT) tuvieron valores basales de IP-10 más elevados que los CC, mientras que los niveles basales de LDL-colesterol e índice de aterogenicidad fueron inferiores que los que presentaron aquellos que portaban el genotipo desfavorable (CT/TT).

30

Tabla 1. Características basales				
	TOTAL (N=99)	INDUCCIÓN (N=50)	ESTÁNDAR (N=49)	P-Valor
EDAD (años)	44 ± 9	45 ± 9	44 ± 9	0,620
SEXO varón (n, %)	67 (67,7)	38 (76)	29 (59)	0,530
IMC (kg/m2)	27 ± 5	28 ± 6	25 ± 4	0,060
Aclaramiento creatinina (mL/hora)	121 ± 31	126 ± 35	115 ± 25	0,100
HOMA-IR	3,6 ± 3,3	3,4 ± 3,2	3,0 ± 2,9	0,240
IP-10 (pg/mL)	351 ± 172	376 ± 173	321 ± 168	0,890
Cortisol (µg /dl)	13,3 ± 5	13,5 ± 5	13,0 ± 5	0,750
Genotipo IL-28B (CT/TT) (n, %)	60 (66,6)	32 (64)	28 (57)	0,760
Carga viral basal (CVB) (Log 10 RNA-VHC)	5,9 ± 0,8	5,9 ± 0,8	5,8 ± 0,8	0,720
METAVIR A2-A3 (n, %)	48 (48,5)	28 (56)	20 (41)	0,125
Esteatosis (n / %)	52 (52,5)	19 (38)	33 (67)	0,071
Esteatosis moderada-severa (n, %)	23 (23,2)	13 (26)	10 (20)	0,170
METAVIR F3-F4	29 (29,3)	14 (28)	15 (30)	0,420

Tabla 1. Características basales				
	TOTAL (N=99)	INDUCCIÓN (N=50)	ESTÁNDAR (N=49)	P-Valor
(n,%)				
Cirrosis hepática (n, %)	21 (21,2)	9 (18)	12 (24)	0,230
Colesterol total (mg/dl)	180 ± 32	181 ± 30	179 ± 35	0,820
LDL-colesterol (mg/dl)	107 ± 30	110 ± 30	104 ± 30	0,370
Triglicéridos (mg/dl)	89 ± 33	88 ± 25	90 ± 41	0,770
HDL-colesterol (mg/dl)	55 ± 18	54 ± 18	56 ± 19	0,620

2.- Análisis de Regresión Logística Univariante (Tablas 2.A y 2.B)

5 Las variables que resultaron estadísticamente significativas fueron:

Tabla 2.A. Tasas de respuesta virológica rápida y respuesta virológica sostenida.					
	RVS N = 52	Ausencia RVS N = 47	Odds Ratio	IC 95%	P-value
Edad (años)	43 ± 10	46 ± 8	1,1	(1,0-1,2)	0,05
IMC (kg/m2)	25 ± 5	28 ± 5	1,1	(1,0-1,2)	< 0,01

Tabla 2.A. Tasas de respuesta virológica rápida y respuesta virológica sostenida.					
	RVS N = 52	Ausencia RVS N = 47	Odds Ratio	IC 95%	P-value
IP-10 basal (pg/mL)	288 ± 147	421 ± 173	1,1	(1,0-1,2)	< 0,0001
Cortisol basal (µg /mL)	12,1 ± 5	14,6 ± 4,5	1,1	(1,0-1,2)	0,012
Aclaramiento creatinina (mL/hora)	110 ± 25,5	133 ± 33	1,1	(1,0-1,2)	< 0,001
CVB (log10 RNA-VHC)	5,7 ± 0,9	6,1 ± 0,6	1,9	1,1-3,2	0,026
Esteatosis hepática (n,%)	19 (36,5)	33 (70,2)	1,9	1,3-2,9	< 0,001
METAVIR F0-F2 (n,%)	44 (88,6)	26 (55,6)	2,9	1,4-5,9	0,002
RV1 (3° o 7° día) (UI/mL log10 RNA-VHC)	(- 2,06 + 0,98)		5,9	2,9-12,4	< 0,0001
RV1 (Dosis inducción)	(-2,2 + 0,9)	(-1,0 + 0,8)	4,9	2,0-11,8	< 0,0001
RV1 (Dosis estándar)	(-1,9 + 1,1)	(- 0,7 + 0,6)	10,9	2,6-45,3	< 0,0001
Reducción 3° día (Log10)	(-1,7 + 0,9)	(-0,8 + 0,6)	5,4	2,6-11,1	< 0,0001

Tabla 2.A. Tasas de respuesta virológica rápida y respuesta virológica sostenida.					
	RVS N = 52	Ausencia RVS N = 47	Odds Ratio	IC 95%	P-value
Reducción 7º día (Log10)	(-1,9 + 1,0)	(-0,7 + 0,6)	6,3	3,0-13,4	< 0,0001
Concentraciones plasmáticas Ribavirina (CPR) (ng/ml)	2,3 ± 1,0	1,9 ± 0,8	-	-	0,064
CPR (1º mes terapia) (ng/ml) GENOTIPO IL- 28B CT/TT	2,5 ± 1,2	1,9 ± 0,8	1,7	1,0-3,1	< 0,05
RESPUESTA VIROLÓGICA PRIMERA SEMANA (RVPS)	49 (94,2)	8 (17)	79,6	19,7- 320,3	< 0,0000
RVPS (Dosis inducción) (n, %)	27 (93,1)	5 (20)	54	9,5-307	< 0,0000
RVPS (Dosis estándar) (n, %)	22 (95,7)	3 (13,6)	139,3	13,3- 1453,6	< 0,0000
VLDL basal (mg/dl)	15,8 ± 5,0	19,1 ± 7,5	0,92	(0,8-1,0)	0,036
LDL-colesterol media (1º mes de terapia) mg/dl	100 ± 23	89 ± 28	1,1	(1,0-1,2)	0,05

Tabla 2.A. Tasas de respuesta virológica rápida y respuesta virológica sostenida.					
	RVS N = 52	Ausencia RVS N = 47	Odds Ratio	IC 95%	P-value
RATIO DE INFECTIVIDAD (Sólo en genotipo CC)	2,5 ± 1,1	4,7 ± 3,2	0,51	(0,3-0,9)	0,020
ESTEATOSIS MODERADA- SEVERA n (%)	5 (9,8)	18 (37,5%)	0,34	0,19-0,60	< 0,0001

Tasa de RVS (52,5%): genotipo CC (56 %) frente CT/TT (44%). Ausencia de RVS: genotipo CC (21%) frente CT/TT (79%): OR (Odds Ratio) 1,7, intervalo de confianza (IC) al 95% (1,3-2,5); p < 0,0001. Tasa de RVR (39%): genotipo CC (61,5%) frente a CT/TT (38,5 %): OR 1,9, IC 95% (1,3-3,0); p < 0,0001.

Se curaron más los pacientes con IP-10 basal más baja (grupo RVS: 288 ± 147 pg/mL) frente a (grupo sin RVS: 421 ± 173 pg/mL): OR 1,0, IC 95% (1,0-1,1); p < 0,0001. También se curaron más los pacientes con aclaramiento de creatinina basal menor (grupo RVS: 110 ± 25 mL/hora) frente a (grupo sin RVS: 133 ± 33 mL/hora): OR 0,97, IC 95% (0,95-0,98); p = 0,001, alcanzando la curación también más en los pacientes con un valor basal de HOMA-IR menor: grupo RVS (2,5 ± 2,3) frente al grupo no curado (4,3 ± 4,2): OR 0,8, IC 95% (0,6-1,0); p = 0,037.

Alcanzaron mayores tasas de RVR los pacientes con niveles plasmáticos más bajos de IP-10 (p = 0,001), aclaramiento de creatinina basal menor (p = 0,011), no habiendo diferencias entre grupos según el valor del HOMA-IR basal (p = 0,42).

Las tasas de RVS fueron mayores en pacientes con fibrosis hepática F0-F2 (42/70, 60 %) frente a F3-F4 (9/23, 31 %): OR 2,9, IC 95% (1,4-5,9); p = 0,001; siendo también mayores

en sujetos no cirróticos (F0-F3: 46/78, 59 %) frente a F4 (5/21, 23,8%): OR 4,7, IC 95% (1,7-13,0); $p = 0,001$. No hubo diferencias en las tasas de RVR, independientemente del grado de fibrosis hepática ($p = 0,52$).

- 5 También se curaron más y alcanzaron mayores tasas de RVR los pacientes con menor carga viral basal (CVB): grupo RVS ($5,7 \pm 0,9 \log_{10}$ RNA) frente al grupo no curado ($6,1 \pm 0,6 \log_{10}$): OR 0,5, IC 95% (0,3-0,9); $p = 0,026$. Grupo RVR ($5,5 \pm 1,0 \log_{10}$) frente a grupo sin RVR ($6,1 \pm 0,5 \log_{10}$): OR 0,4, IC 95% (0,2-0,6); $p < 0,0001$.
- 10 Tuvieron mayores tasas de curación, tal como se expone en la tabla 2.A, los pacientes que alcanzaron la Respuesta Viroológica de la Primera Semana (RVPS), respecto a aquellos que no la alcanzaron, de forma estadísticamente significativa, predominando además, en los pacientes que alcanzaron la RVPS, niveles de exigencia fibro-viroológica más bajos, mientras que en el grupo con ausencia de RVS, ocurría al contrario, predominaban los pacientes con
- 15 un nivel de exigencia mayor (4 o 5). Además se confirmó la mayor potencia predictiva de la Respuesta Viroológica de la Primera Semana para predecir las tasas de RVS frente a las tasas de respuesta virológica rápida (RVR). El AUROC que le correspondió a la RVPS fue de un 89% frente a un 75% para la RVR.

20

TABLA 2.B. Relación entre la cinética lipídica durante el 1º mes de terapia antiviral con las tasas de RVS, las tasas de RVR, el polimorfismo genético de la IL-28B y la presencia y severidad de esteatosis hepática.

	Grupo RVS	Ausencia RVS	Odds Ratio	IC 95%	P-valor
AUSENCIA DE ESTEATOSIS n (%)	33 (64,7)	15 (31,3)	0,34	(0,19-0,60)	< 0,0001
ESTEATOSIS LEVE n (%)	12 (25,5)	16 (31,3)			
ESTEATOSIS MODERADA-SEVERA n (%)	5 (9,8)	18 (37,5%)			
Ascenso medio de triglicéridos 1º mes terapia (mg/dl) (Sólo genotipo CC)	101 ± 29	147 ± 65	0,97	(0,94-0,99)	0,027

TABLA 2.B. Relación entre la cinética lipídica durante el 1º mes de terapia antiviral con las tasas de RVS, las tasas de RVR, el polimorfismo genético de la IL-28B y la presencia y severidad de esteatosis hepática.					
	Grupo RVS	Ausencia RVS	Odds Ratio	IC 95%	P-valor
RATIO DE INFECTIVIDAD (Sólo en genotipo CC)	2,5 ± 1,1	4,7 ± 3,2	0,51	(0,3-0,9)	0,020
VLDL basal (mg/dl)	15,8 ± 5,0	19,1 ± 7,5	0,92	(0,8-1,0)	0,036
METABOLISMO LIPÍDICO FAVORABLE n (%)	40 (80,4)	18 (35,4)	7,4	(3,0-18,6)	< 0,0001
GENOTIPO CC + METABOLISMO LIPÍDICO FAVORABLE n (%)	23 (85,7)	2 (27,3)	16,0	(2,9-87,3)	< 0,0001
GENOTIPO CT/TT + METABOLISMO LIPÍDICO FAVORABLE n (%)	16 (73,9)	15 (37,8)	4,6	(1,5-14,6)	< 0,0001
*LDL-colesterol media (1º mes de terapia) mg/dl	100 ± 23	89 ± 28	1,1	(1,0-1,2)	0,05
**LDL-colesterol media (1º mes de terapia) mg/dl	92 ± 24	76 ± 18	1,1	(1,0-1,2)	0,026

TABLA 3.Relación metabolismo lipídico y esteatosis hepática					
	Ausencia Esteatosis hepática	Esteatosis Hepática Moderada-severa	Odds Ratio	IC 95%	Valor P
VLDL basal (mg/dl)	15,0 ± 4,3	21,1 ± 7,9	1,1	(1,0-1,2)	0,005
Ratio infectividad (1º mes de terapia)	2,9 ± 2,8	4,5 ± 3,0	1,1	1,0-1,1	0,042
Ratio de infectividad elevado (RI > 3,2) n (%)	13 (27,1)	13 (56,5)	1,9	(1,1-4,4)	0,048
HDL-colesterol medio (1º mes terapia) (mg/dl) (Sólo genotipo CT/TT)	50 ± 19	40 ± 12	0,85	(0,7-0,9)	0,033
Genotipo CC n (%)	26 (54,2)	5 (21,7)	1,3	(1,1-1,5)	0,013
Genotipo CT/TT n (%)	22 (45,8)	18 (78,3)	-	-	0,754
RVS n (%)	33 (68,8)	5 (21,7)	0,2	(0,1-0,6)	< 0,0001
Ausencia RVS (%)	15 (31,3)	18 (78,3)	0,5	(0,2-0,9)	< 0,0001

Los pacientes con ausencia de esteatosis hepática (EH) se curaron más que aquellos con presencia de esteatosis hepática, siendo más marcada las diferencias cuando el grado de EH era moderada o severa. Los pacientes que tuvieron un ratio de infectividad durante el 1º mes de terapia elevado (> 3,2), pese a presentar un genotipo de la IL-28B favorable (CC), se curaron menos que aquellos que lo tuvieron bajo. Este hecho no se evidenció en pacientes con genotipo desfavorable (CT/TT). También se curaron más aquellos sujetos que tuvieron una secreción menor de VLDL basal. Los pacientes, independientemente del genotipo de la IL-28B que tuvieran, que consiguieron mantener unas concentraciones plasmáticas medias de LDL-colesterol mayores durante el 1º mes de terapia se curaron más que aquellos que mantuvieron durante este periodo unas concentraciones más bajas (figura 2).

Además se evidenció que existía una correlación positiva entre los niveles basales de VLDL y el valor del ratio de infectividad durante el 1º mes de terapia antiviral (coeficiente de Pearson =0,658), la cual se expresa en la figura 3.

5 Esto podría explicarse debido a que éstos pacientes son aquellos que mantienen una actividad óptima de la lipoprotein lipasa. Sin embargo, cuando valorábamos exclusivamente los pacientes con genotipo desfavorable de la IL-28B (CT/TT), alcanzaban mayores tasas de Respuesta Viroológica Rápida (RVR), aquellos paciente en los que ocurría al contrario, es decir, mantenían durante el 1º mes de terapia unas concentraciones plasmáticas de LDL-
10 colesterol medias menores: 74 ± 20 mg/dl (genotipos CT o TT con presencia de RVR) frente a aquellos que no la alcanzaron (91 ± 27 mg/dl): OR 0,97, IC 95% (0,95-0,99); p =0,041. Estas diferencias no se evidenciaban en los pacientes con genotipo IL-28B favorable (CC); p = 0,85.

15 Además ninguno de los pacientes con genotipo IL-28B desfavorable (CT/TT) que presentaron esteatosis hepática moderada-severa consiguieron alcanzar la RVR (0/15, 0%) frente a aquellos con ausencia de esteatosis hepática (8/15, 53,3 %); OR 0,34, IC 95% 0,14-0,81; p = 0,015. Estas diferencias no eran observadas en pacientes con genotipo IL-28B favorable (CC).

20 Estos resultados podrían ser explicados probablemente por el hecho de que conseguirían una indetectabilidad viral al mes de terapia con más frecuencia en aquellos pacientes, que pese a tener un genotipo desfavorable de la IL-28B, presentaban probablemente una menor secreción de lipovirpartículas en forma de VLDL, como sustrato necesario para la
25 producción de las moléculas LDL-colesterol, y que, a su vez, podría depender del grado de esteatosis hepática. La densidad de proteínas virales asociadas a las lipovirpartículas segregadas en pacientes sin esteatosis o esteatosis leve probablemente será probablemente menor que la presentada por los sujetos con grados moderados o severos de esteatosis, comportándose estos conglomerados esteatósicos como potenciales
30 reservorios virales.

Los pacientes que tuvieron mayor grado de esteatosis hepática tuvieron una secreción basal mayor de VLDL que aquellos que no la tuvieron. Los pacientes que tuvieron genotipo de la IL-28B desfavorable (CT o TT) tuvieron mayores tasas de esteatosis hepática y su grado de
35 severidad esteatósica fue también mayor. Los pacientes con genotipo de la IL-28B favorable que tuvieron mayor elevación de triglicéridos medios o un valor del Ratio de Infectividad

mayor durante el 1º mes de terapia se curaron menos que aquellos que mantuvieron menores concentraciones de triglicéridos medios o un valor inferior del Ratio de Infectividad durante este periodo. En los pacientes con genotipo CT o TT de la IL-28B que tuvieron esteatosis hepática se consumieron más las moléculas de HDL-colesterol durante el 1º mes de terapia que aquellos que no presentaron esteatosis, lo que a su vez, podría incrementar el ratio de infectividad en estos pacientes, al reducir el denominador de dicho cociente, lo que equivaldría a un menor grado de competencia frente al virus por la posible entrada viral a través de los receptores Scavenger. Los pacientes sin esteatosis hepática se curaron más que aquellos que tenían esteatosis hepática.

10

En base a estos resultados, y partiendo del hecho que es mucho más difícil de curar con biterapia estándar un paciente cirrótico (F4) que un sujeto no cirrótico (F0-F3), igual que no es lo mismo intentar curar un paciente con CVB muy alta que durante el 1º mes de terapia tiene un ratio de infectividad elevado ($> 3,2$) frente a otro con CVB muy baja, establecimos 5 niveles de exigencia lipídica, los cuales nos permitían clasificar a nuestros pacientes según su grado de fibrosis hepática (cirrótico o no cirrótico), carga viral basal (muy alta, alta, baja o muy baja) y de acuerdo al valor del ratio de infectividad (cociente entre la elevación media de triglicéridos plasmáticos durante el 1º mes de terapia dividido por el nivel medio de HDL-colesterol durante este periodo):

20

- Niveles 5 y 4 de Exigencia Lipídica (NEL 5 y 4):

Dentro de este grupo incluimos aquellos pacientes, que a priori, eran más difíciles de curar, al tener mayor grado de fibrosis hepática (cirróticos o F4) y/o CVB muy elevada ($>3.000.000$ UI/mL), en función de que tuvieran un ratio de infectividad elevado ($>3,2$) durante el 1º mes de terapia (Nivel 5 o NEL 5) o un ratio de infectividad bajo ($<3,2$): (Nivel 4 o NEL 4). Para que dichos pacientes alcanzaran lo que llamaríamos un “Metabolismo Lipídico Favorable (MLF)”, era necesario que mantuviesen unos niveles medios de LDL-colesterol durante el 1º mes de terapia (mLDLc) más elevados para poderse curar, como reflejo de una actividad óptima de la lipoprotein lipasa, como mecanismo compensador y limitante de la infectividad viral a través de los receptores de LDL-colesterol. Así se estableció la necesidad de mantener durante el 1º mes de terapia unas concentraciones plasmáticas mínimas por encima de 110 mg/dl para (NEL 5) y de 105 mg/dl para (NEL 4).

35

- Para el Nivel de Exigencia lipídica 3 o 2 :

A este grupo fueron asignados los pacientes no cirróticos (F0-F3) con CVB alta o baja, que tenían un ratio de infectividad elevado (NEL 3), o bien, un ratio de infectividad bajo (NEL 2): en ambos niveles la concentración media de LDL-colesterol que tendría que mantener el paciente para alcanzar el llamado MLF sería inferior a 100 mg/dl, estableciéndose como punto de corte para el NEL 3 un valor medio de mLDLc de al menos 80 mg/dl, mientras que para el NEL 2, un valor mLDLc de al menos 65 mg/dl.

- En el nivel 1 (NEL 1) fueron asignados aquellos sujetos no cirróticos (F0-F3) con carga viral basal muy baja (RNA-VHC < 100000 UI/mL), independientemente del valor del ratio de infectividad. Para que el paciente alcanzara un MLF se estableció un valor medio de mLDLc de al menos 45 mg/dl.

Se confirmó el hecho de que aquellos pacientes que consiguieron mantener unas concentraciones medias de LDL-colesterol durante el 1º mes de terapia más elevadas se curaron más que los pacientes que no consiguieron mantenerla al menos igual o por encima del valor establecido para el nivel de exigencia lipídica (NEL) al que pertenecía dicho paciente: las concentraciones plasmáticas medias en los sujetos con metabolismo lipídico favorable (MLF) fueron 104 ± 25 mg/dl frente a 73 ± 19 mg/dl en los pacientes que no lo presentaron: OR 1,1, IC 95% (1,0-1,2); $p < 0,0001$. Así observamos como en los niveles de exigencia lipídica elevados (4 y 5) predominaban los pacientes que no alcanzaban un metabolismo o cinética lipídica favorable, por ello, se curaban menos. Sin embargo, los pacientes pertenecientes a niveles de exigencia lipídica inferiores (3- 1) la tasa de presencia de MLF fue mayor, invirtiéndose la tendencia a curarse con mayor probabilidad: presencia de metabolismo lipídico favorable (MLF) en 41/52 (78,8 % en el grupo RVS frente al 36,2% (17/47) (grupo sin RVS): OR 7,4, IC 95% (3,0-18,6); $p < 0,0001$. Además estas diferencias se mantenían independientemente del genotipo de la IL-28B que tuviera el paciente. Además observamos que los pacientes que tenían un genotipo favorable de la IL-28B (CC) presentaron con mayor frecuencia un metabolismo lipídico favorable (MLF) durante el 1º mes de terapia de forma estadísticamente significativa que aquellos con genotipo desfavorable: presencia de un MLF: (27/39, 69,2 %) si genotipo CC frente al grupo CT/TT (27/60, 45 %): OR 1,3, IC 95 % (1,1-1,6), $p < 0,05$.

A continuación se exponen los 2 modelos de regresión logística multivariante resultante durante el estudio:

35

Tabla 4. Niveles de exigencia lipídica (NEL)					
NEL	Pacientes n (%)	LDL media Necesaria (mg/dl)	Presencia de Metabolismo Lipídico Favorable n (%)	Ausencia de Metabolismo Lipídico Favorable n (%)	RVS n (%)
NEL 5	F4 CVB muy alta RI >3,2	≥ 110	10,2	37,5	14
NEL 4	Cirróticos CVB muy alta RI < 3,2	≥ 105	11,9	37,5	12
NEL 3	No cirróticos CVB alta o baja RI > 3,2	≥ 80	16,9	7,5	16
NEL 2	No cirróticos CVB alta o baja RI < 3,2	≥ 65	39	17,5	33
NEL 1	No cirróticos CVB muy baja RI alto o bajo	≥ 45	22	0	25

Tabla 5. Modelos multivariados de respuesta sostenida virológica y predictores seleccionados				
Característica	MODELO 1		MODELO 2	
	Odds Ratio (95% CI)	P-valor	Odds Ratio (95% CI)	P-valor
Concordancia de Viro-lipídica cinética. (RVPS lograda/MLF logrado)	90,62 (5,73-1431,81)	0,001	96,32 (5,44-1703,30)	0,002
Cortisol sérico basal (µg/dl)	1,44 (1,03-2,00)	0,032	1,52 (1,04-2,18)	0,031
Requerimiento fibro-virológico (FVR5/FVR4/FVR3/FVR2/FVR1)	4,05 (1,06-15,52)	0,041	4,15 (1,02-16,79)	0,046
Aclaramiento de la creatina (mL/h)	1,12 (1,03-1,21)	0,005		
IP-10 sérica (pg/ml)	1,02 (1,00-1,03)	0,014	1,02 (1,00-1,03)	0,015
Genotipo IL-28B (CC-IL-28B/CT o TT-IL-28B)	7,99 (1,06-60,25)	0,044	7,52 (1,03-54,62)	0,046
Tipo de metabolismo lipídico (MLF logrado/MLD logrado)	78,29 (1,52-4016,37)	0,030	69,14 (1,31-3640,03)	0,036
Aclaramiento de la ribavirina (mL/h)			2,37 (1,28-4,38)	0,006
Sensibilidad (%)	94,1		92,1	
Especificidad (%)	93,8		93,7	
Valor predictivo positivo (%)	94,1		94	
Valor predictivo negativo (%)	93,8		91,8	

Modelos ajustados de acuerdo con el valor inicial de la carga viral, el grado de fibrosis hepática, variables edad y sexo. Abreviaturas: RVPS (Respuesta Virológica de la Primera Semana); MLF (Metabolismo lipídico favorable); MLD (metabolismo lipídico desfavorable o ausencia de metabolismo lipídico favorable).

4. Curvas ROC y AUROC.

Se expresan en la figura 1.

5. Presentación de las 3 Escalas Onuba (Tabla 6)

5

1ª) Escala Onuba Basal (4 variables basales) con su puntuación total.

2ª) Escala Onuba-Week (presencia o no de la Respuesta Viroológica 1ª Semana o RVPS), con su puntuación.

10 3ª) Escala Onuba-Month: presencia o no de un Metabolismo Lipídico Favorable (MLF) o metabolismo lipídico desfavorable (MLD).

Tabla 6. ESCALAS ONUBA	
<u>PARTE 1: FACTORES BASALES</u> <u>(ESCALA ONUBA BASAL- EOB)</u>	PUNTUACIÓN TOTAL _____
A) IP-10 SÉRICA	
a) Si IP-10 \leq 409,9 pg / mL	(+2 puntos)
b) Si IP-10 = 410-599 pg/mL	(-1 punto)
c) Si IP-10 > 600 pg/mL	(-2 puntos)
B) GENOTIPO DE LA INTERLEUCINA-28B (IL-28B)	
a) Si Genotipo IL-28B (CC)	(+2 puntos)
b) Si Genotipo IL-28B (CT o TT)	(-1 punto)
C) CORTISOL SÉRICO	
a) Si Cortisol \leq 12,9 μ g / dl	(+ 2 puntos)
b) Si Cortisol = 13-17,9 μ g /dl:	(-1 punto)
c) Si Cortisol \geq 18 μ g / dl	(-2 puntos)
D) ACLARAMIENTO DE CREATININA (Aclar)	
a) Si Aclaramiento de creatinina \leq 115,9 mililitro/hora	(+ 2 puntos)
b) Si Aclaramiento de creatinina = 116-139 mililitro/hora	(- 2 puntos)
c) Si Aclaramiento de creatinina \geq 140 mililitro/hora	(- 4 puntos)
<u>PARTE 2: PRESENCIA RESPUESTA VIROLÓGICA DE LA PRIMERA SEMANA (RVPS)</u> <u>(ESCALA ONUBA-WEEK- EOW)</u>	
NIVELES DE EXIGENCIA FIBRO-VIROLÓGICA	PUNTUACIÓN TOTAL _____
RV1 = máxima reducción de la carga viral (\log_{10} UI / mL) al 3º día o 7º día de terapia antiviral	

<u>NIVEL 5:</u> CARGA VIRAL BASAL MUY ALTA ($> 6 \times 10^6$ UI/mL)	
(- 5 puntos)	* Si VR1 $< 2,5 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
(+ 5 puntos)	* Si VR1 $\geq 2,5 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
<u>NIVEL 4:</u> CARGA VIRAL BASAL MUY ALTA (5999999-3000000 UI/mL) o F4 (CIRROSIS)	
(- 5 puntos)	* Si VR1 $< 1,4 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
(+ 5 puntos)	* Si VR1 $\geq 1,4 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
<u>NIVEL 3:</u> CARGA VIRAL BASAL ALTA (2999999 - 850000 UI/mL) y F0-F3 (NO CIRROSIS)	
(- 4 puntos)	* Si VR1 $< 1,2 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
(+4 puntos)	* Si VR1 $\geq 1,2 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
<u>NIVEL 2:</u> CARGA VIRAL BASAL BAJA (849999 - 100000 UI/mL) y F0-F3 (NO CIRROSIS)	
(- 4 puntos)	* Si VR1 $< 0,8 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
(+ 4 puntos)	* Si VR1 $\geq 0,8 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
<u>NIVEL 1:</u> CARGA VIRAL BASAL MUY BAJA (< 100000 IU/mL) y F0-F3 (NO CIRROSIS)	
(- 4 puntos)	* Si VR1 $< 0,5 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
(+ 4 puntos)	* Si VR1 $\geq 0,5 \log_{10}$ UI / mL respecto a la carga viral basal:
PARTE 3: PRESENCIA DE METABOLISMO LIPÍDICO FAVORABLE (MLF)	
NIVELES DE EXIGENCIA LIPÍDICA (NEL) Puntuación TOTAL _____	
<u>NEL 5:</u> Este nivel se aplicará a pacientes con:	
* CIRROSIS (F4) + RATIO DE INFECTIVIDAD ALTO (RI $\geq 3,2$), independientemente de la carga viral basal	
* NO CIRROSIS + RATIO INFECTIVIDAD ALTO (RI $\geq 3,2$) + CARGA VIRAL BASAL MUY ALTA (≥ 3000000 UI/mL)	
A) Si el valor medio de LDL-c durante el 1º mes de terapia (mLDL-c) ≥ 110 mg/dl	
(+ 4 puntos): MLF	
B) Si el valor medio de LDL-c durante el 1º mes de terapia (mLDL-c) < 110 mg/dl	
(- 4 puntos): MLD	
<u>NEL 4:</u> Este nivel se aplicará a pacientes con:	
* CIRROSIS (F4) + Ratio de infectividad BAJO (RI $< 3,2$) + Carga viral basal < 3000000 UI / mL	
* NO CIRROSIS + Ratio infectividad BAJO (RI $< 3,2$) + Carga viral basal MUY ALTA (≥ 3000000 UI/mL)	

<p>A) Si el valor de mLDL-c es ≥ 105 mg/dl durante el 1º mes de terapia: (+ 4 puntos): MLF B) Si el valor de mLDL-c es < 105 mg/dl durante el 1º mes de terapia: (- 4 puntos): MLD</p>
<p>NEL 3: Este nivel se aplicará a pacientes con:</p>
<p>* (F0-F3) + Ratio de infectividad ALTO (RI $\geq 3,2$) + Carga viral basal ALTA o BAJA (2999999 -100000 UI/mL)</p>
<p>A) Si mLDL-c ≥ 80 mg/dl durante el 1º mes de terapia: (+ 3 puntos): MLF B) Si mLDL-c < 80 mg/dl durante el 1º mes de terapia: (- 3 puntos): MLD</p>
<p>NEL 2: Este nivel se aplicará a pacientes con:</p>
<p>* (F0-F3) + Ratio de infectividad BAJO (RI $< 3,2$) + Carga viral basal ALTA o BAJA (2999999 -100000 UI/mL)</p>
<p>A) Si mLDL-c ≥ 65 mg/dl durante el 1º mes de terapia: (+ 3 puntos): MLF B) Si mLDL-c < 65 mg/dl durante el 1º mes de terapia: (- 3 puntos): MLD</p>
<p>NEL 1: Este nivel se aplicará a pacientes con:</p>
<p>* (F0-F3) + Ratio de infectividad BAJO (RI $< 3,2$) + Carga viral basal MUY BAJA (< 100000 UI/mL)</p>
<p>A) Si mLDL-c ≥ 45 mg/dl durante el 1º mes de terapia (+ 2 puntos):MLF B) Si mLDL-c < 45 mg/dl durante el 1º mes de terapia 2 puntos): MLD (-</p>
<p>ESCALA ONUBA-MONTH (EOM) _____ PUNTOS</p>
<p>PARTE 4) TOMA DE DECISIONES</p>
<p>Si la puntuación obtenida en ambas escalas (ESCALA ONUBA BASAL y ESCALA ONUBA-WEEK) está comprendida: A) ENTRE (-4) y (-18) PUNTOS: <u>SUSPENDER terapia</u> al alcanzar la <u>1ª SEMANA</u> de terapia:<u>INICIAR TRIPLE TERAPIA</u> B) ENTRE (-3) y (+17) PUNTOS: MANTENER terapia hasta el 1º mes de terapia. CALCULAR puntuación de la ESCALA ONUBA-MONTH: * Si la puntuación de la ESCALA ONUBA-MONTH entre (+1 punto) y (+17 puntos): MANTENER TERAPIA ANTIVIRAL * Si el score de la ESCALA ONUBA-MONTH entre (0 punto) y (-18 puntos): SUSPENDER biterapia: iniciar TRIPLE TERAPIA ANTIVIRAL.</p>

6. Puntuaciones media de cada una de las 3 escalas

En la tabla 7 se exponen las puntuaciones medias de las 3 escalas con su desviación estándar. Se exponen las puntuaciones diferenciando entre pacientes curados y no curados y las puntuaciones diferenciando entre Null-responders, parciales o recidivantes.

Abreviaciones: SVR (respuesta virológica sostenida); Non-SVR (ausencia de respuesta virológica sostenida); IC (intervalo de confianza); SD (desviación estándar; Nulo-R (pacientes respondedores nulo); Parcial-R (pacientes respondedores parciales); EO (escala onuba)

Destacamos también la gran potencia predictora de nuestro modelo predictivo en cuanto a su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Concretamente, para la primera escala (Escala Onuba Basal), la sensibilidad fue del 92,2%, especificidad del 79,2%, el valor predictivo positivo del 81,2% y un valor predictivo negativo del 88,3%. Estos porcentajes van incrementándose conforme añadimos la variable Presencia o no de la Respuesta Virológica de la Primera Semana (RVPS) como marcador cinético viral, que rige los resultados de la 2ª escala predictiva (Escala Onuba-Week), la cual presentó una sensibilidad del 91,7%, especificidad del 94,1%, valor predictivo positivo del 92,3% y un valor predictivo negativo del 93,6%. Finalmente si añadíamos la variable de la cinética lipídica, es decir, presencia de un metabolismo lipídico favorable o no, variable que generaba las puntuaciones de la 3º escala, llegábamos a alcanzar una potencia predictiva del modelo aún mayor, concretamente, la Escala Onuba-Month tenía una sensibilidad y valor predictivo negativo del modelo del 92% y una especificidad y valor predictivo positivo del 95,8.

Tabla 7. Puntuación de la Escala Onuba (EO), dependiendo del tiempo de la terapia.							
PUNTUACIÓN ESCALA ONUBA	SVR Media ± SD	Non-SVR Media ± SD	95% IC	P-valor	Nulo-R	Parcial-R	Relapser
PUNTUACIÓN PRETRATAMIENTO (PREONUBA)	3,0 ± 2,8	-3,3 ± 2,9	2,1 (1,6-2,9)	<0,0001	(-4,8 ± 3,7)	(-2,5 ± 2,4)	(-2,9 ± 3,3)
PUNTUACIÓN PRIMERA SEMANA (ONUBA SEMANA)	7,7 ± 3,7	-6,2 ± 4,9	1,6 (1,3-1,9)	<0,0001	(-9,3 ± 3,6)	(-5,4 ± 5,1)	(-5,1 ± 6,2)
PUNTUACIÓN MENSUAL (ONUBA MES)	10,4 ± 4,7	-7,0 ± 6,0	1,9 (1,3-2,9)	<0,0001	(-12,6 ± 5,5)	(-6,6 ± 4,9)	(-5,5 ± 6,6)

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado + ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1), que comprende:

a) obtener muestras biológicas aisladas de un individuo a distintos tiempos T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4 ,

b) identificar a T_0 :

(i) la IP-10 sérica (pg/mL),

(ii) el genotipo de IL-28 (CC, CT y TT),

(iii) el cortisol sérico (mg/dl)

(iv) el aclaramiento de la creatina (mL/hora),

- a T_0 , T_1 , T_2 :

(v) la carga viral (\log_{10} UI/mL),

- a T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4

(vi) valor medio de LDL-c durante el primer mes, tomado a T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4

(vii) grado de fibrosis hepática

(viii) valor del ratio de infectividad, que se considera como el cociente entre LDL-colesterol media durante 1º mes de terapia y la concentración media de HDL-colesterol durante este periodo)

c) calcular dos índices (Week y Month) asignando una puntuación según los distintos valores de los marcadores a los distintos tiempos, donde:

(i) si la IP-10 < 409,9 pg / mL, se le asignan +2 puntos; si la IP-10 = 410-599 pg/mL, se le asigna -1 punto; Si la IP-10 > 600 pg/mL se le asigna -2 puntos.

(ii) si el genotipo de IL-28B es CC se le asignan +2 puntos; si el genotipo de IL-28B es CT o TT se le asigna -1 puntos.

(iii) si el cortisol sérico < 12,9 mg / dl se le asignan + 2 puntos; si el cortisol sérico = 13-17,9 mg/dl se le asigna -1 punto; si el cortisol sérico > 18 mg/dl se le asignan -2 puntos.

(iv) si el aclaramiento de la creatinina es < 115,9 mililitro/hora se le asignan + 2 puntos; si el aclaramiento de la creatinina es = 116-139 mililitro/hora se le asignan -2 puntos; si el aclaramiento de la creatinina es > 140 mililitro/hora se le asignan -4 puntos.

(v) si la carga viral basal es > 6×10^6 UI/mL y si RV1 < 2,5 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan - 5 puntos; si la carga viral basal es > 6×10^6 UI/mL y si RV1 \geq 2,5 \log_{10} UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan +5 puntos; si carga viral basal está comprendida entre 5999999-3000000 UI/mL o si F4

(Cirrosis) y si $RV1 < 1,4 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan - 5 puntos; si carga viral basal comprendida entre 5999999-3000000 UI/mL o si F4 (Cirrosis) y si $RV1 \geq 1,4 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan + 5 puntos; si carga viral basal está comprendida entre 2999999-850000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si $RV1 < 1,2 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan - 4 puntos; si carga viral basal está comprendida entre 2999999-850000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si $RV1 \geq 1,2 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan + 4 puntos; si carga viral basal está comprendida entre 849999-100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si $RV1 < 0,8 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan - 4 puntos; si carga viral basal está comprendida entre 849999-100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si $RV1 \geq 0,8 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan +4 puntos; si carga viral basal es < 100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si $RV1 < 0,5 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan - 4 puntos; si carga viral basal es < 100000 UI/mL y si F0-F3 (No cirrosis) y si $RV1 \geq 0,5 \log_{10}$ UI/mL respecto a la carga viral basal se le asignan +4 puntos.

(vi) si existe cirrosis (F4) y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) e independientemente de la carga viral basal o si no existe cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y carga viral basal ≥ 3000000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 110 mg/dl se le asignan +4 puntos; si existe cirrosis (F4) y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) e independientemente de la carga viral basal o si no existe cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y la carga viral basal ≥ 3000000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 110 mg/dl se le asignan -4 puntos; si existe cirrosis (F4) y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal (< 3000000 UI/mL) o si no existe cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y la carga viral basal es ≥ 3000000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 105 mg/dl se le asignan +4 puntos; si cirrosis (F4) y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal (< 3000000 UI/mL) o si no existe cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal es ≥ 3000000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 105 mg/dl se le asignan -4 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y carga viral basal se encuentra comprendida entre 2999999-100000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 80 mg/dl se le asignan +3 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad alto ($RI \geq 3,2$) y carga viral basal se encuentra comprendida entre 2999999-100000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) < 80 mg/dl se le asignan -3 puntos; si no

5 cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal que presenta el
 paciente está comprendida entre 2999999-100000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c
 durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 65 mg/dl se le asignan +3 puntos; si no
 cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal está comprendida
 10 entre 2999999-100000 UI/mL y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de
 terapia (mLDL-c) < 65 mg/dl se le asignan -3 puntos; si no cirrosis y ratio de
 infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal es < 100000 UI/mL y si el valor medio
 de LDL-c durante el primer mes de terapia (mLDL-c) ≥ 45 mg/dl se le asignan +2
 puntos; si no cirrosis y ratio de infectividad bajo ($RI < 3,2$) y carga viral basal muy
 15 baja (< 100000 UI/mL) y si el valor medio de LDL-c durante el primer mes de terapia
 (mLDL-c) < 45 mg/dl se le asignan -2 puntos.

2.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:

15 d) predecir a la semana del inicio del tratamiento la respuesta viral sostenida del
 individuo del paso (a) según el índice:

$$\text{Week} = i + ii + iii + iv + v$$

20 e) predecir al mes del inicio del tratamiento la respuesta viral sostenida del individuo
 del paso (a) según el índice:

$$\text{Month} = i + ii + iii + iv + v + vi$$

25 f) donde los tiempos T_0, T_1, T_2, T_3 y T_4 , corresponden a 0, 3, 7, 14 y 30 días desde el
 inicio del tratamiento de la reivindicación 1, respectivamente.

3.- El método según la reivindicación anterior, donde si Week está comprendido entre -4 y -
 18 puntos se recomienda suspender la biterapia y se recomienda iniciar la triple terapia; si la
 suma está comprendida entre -3 y +18 se recomienda mantener la terapia hasta finalizar el
 30 primer mes y adicionar la siguiente puntuación Month.

4.- El método según las reivindicaciones 2-3 donde si Month está comprendido entre +1 y
 +17 puntos se debe mantener la terapia antiviral; si la suma está comprendida entre 0 y -18
 se debe suspender la biterapia e iniciar la triple la terapia antiviral.

35

- 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación de la cantidad de IP10 sérica se realiza utilizando la técnica ELISA.
- 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación del genotipo de IL28B se realiza mediante PCR.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación del cortisol sérico se realiza mediante técnica de ELISA.
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el aclaramiento de la creatina se realiza mediante la fórmula estandarizada: Aclaramiento de creatinina (mililitro /hora) para (sexo masculino) = $(140 - \text{edad}) \times \text{peso} / 72 \times \text{creatinina sérica basal (mg/dl)}$ y para la (sexo femenino) = $(140 - \text{edad}) \times \text{peso} \times 0,85 / 72 \times \text{creatinina sérica basal (mg/dl)}$.
- 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación de la carga viral se realiza mediante PCR.
- 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación de LDL-c, HDL-c y triglicéridos se realiza mediante métodos enzimático-calorimétricos (Roche Diagnostics), usando tubos Vacutainer con EDTA. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) se calcularon por la fórmula de Friedewald.
- 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación del grado de fibrosis se realiza según la escala metavir (F0-F4).
- 12.- Un kit para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado + ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1), que comprende los elementos necesarios para detectar:
- (i) la IP-10 sérica
 - (ii) el genotipo de IL-28
 - (iii) el cortisol sérico
 - (iv) el aclaramiento de la creatina
 - (v) la carga viral
 - (vi) valor LDL-c, HDL-c y triglicéridos
 - (vii) grado de fibrosis hepática

- 13.- El kit según la reivindicación anterior, donde la IP-10 sérica se determina mediante el kit humano Quantikine IP-10/CXCL10/IP-10, basado en enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Vitro SA).
- 5 14.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, donde el genotipo de IL-28 se determina mediante cabo por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real.
- 15.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, donde el cortisol sérico se determina mediante inmunoensayo basado en la electroquimioiluminiscencia.
- 10 16.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, donde el aclaramiento de la creatina se determina mediante la fórmula estandarizada: Aclaramiento de creatinina (mililitro /hora) para (sexo masculino) = $(140 - \text{edad}) \times \text{peso} / 72 \times \text{creatinina sérica basal (mg/dl)}$ y para la (sexo femenino)= $(140 - \text{edad}) \times \text{peso} \times 0,85 / 72 \times \text{creatinina sérica basal (mg/dl)}$.
- 15 17.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-16, donde la carga viral se determina mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)
- 20 18.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-17, donde el valor LDL-c, HDL-c y triglicéridos se determina mediante métodos enzimático-colorimétricos.
- 19.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-18, donde el grado de fibrosis hepática se determina mediante la realización de una biopsia hepática percutánea obtenida en los 6 meses previos a la fecha de inicio de la terapia antiviral aplicando el score METAVIR.
- 25 20.- El uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-19 para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con interferón pegilado + ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1).
- 30

FIG. 1

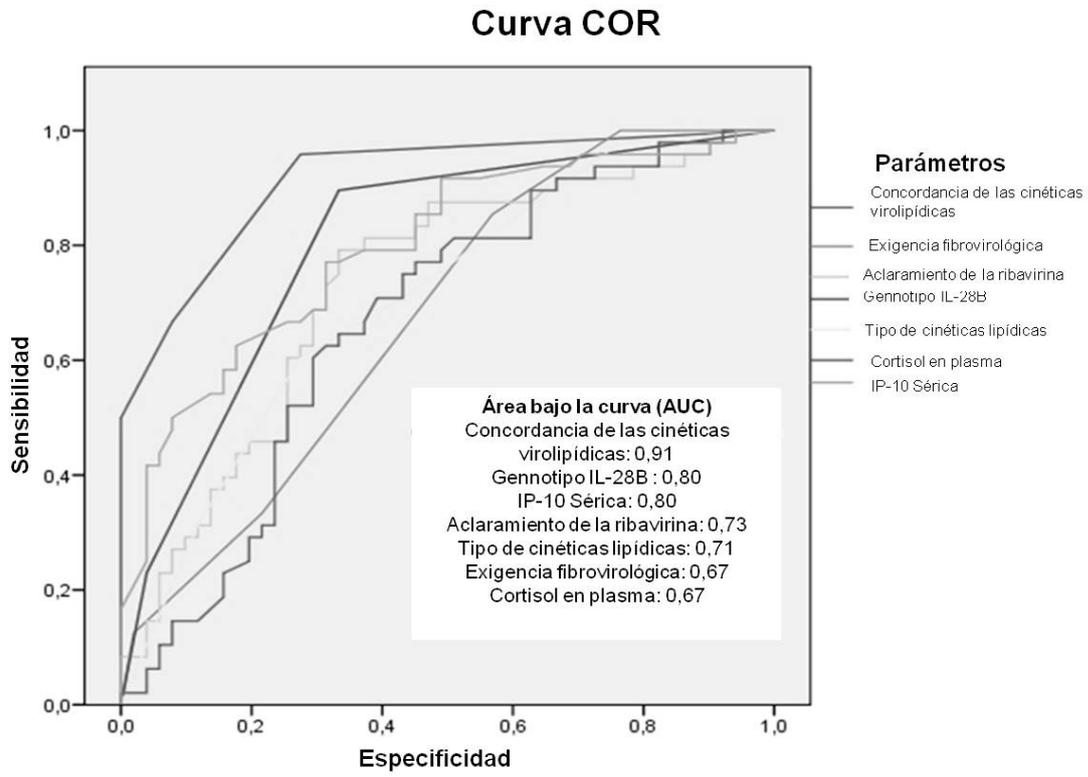


FIG.2

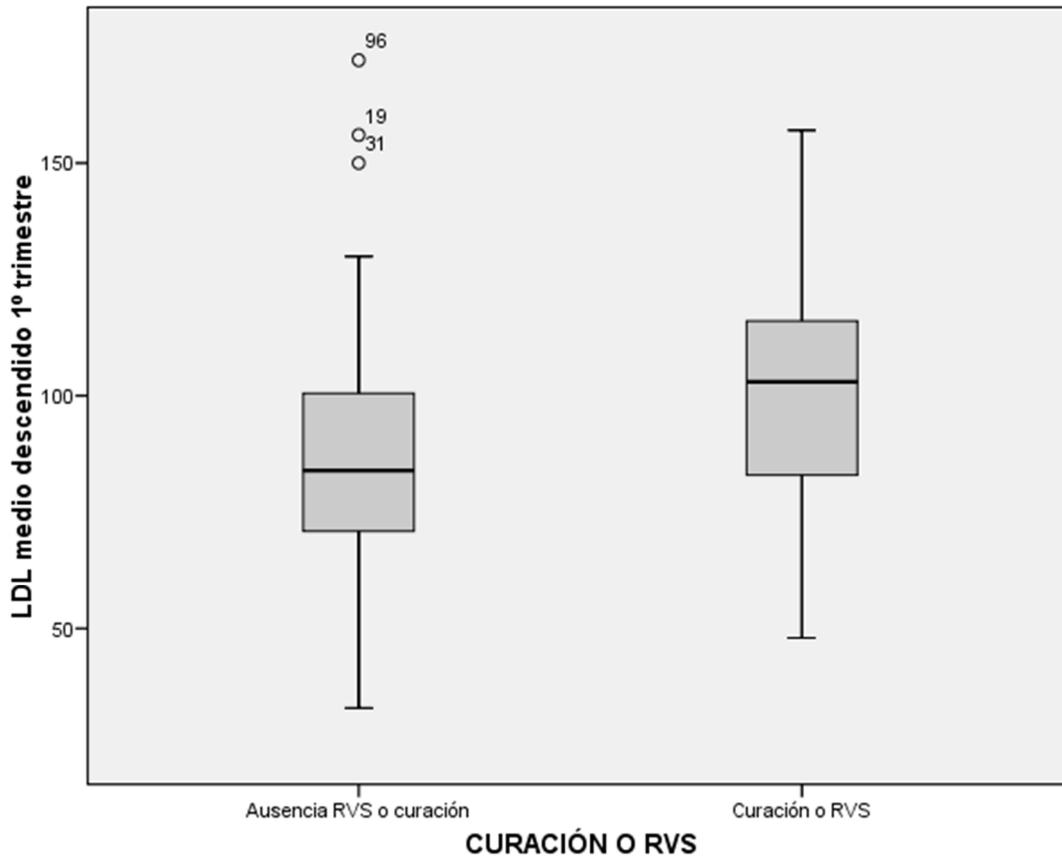


FIG.3

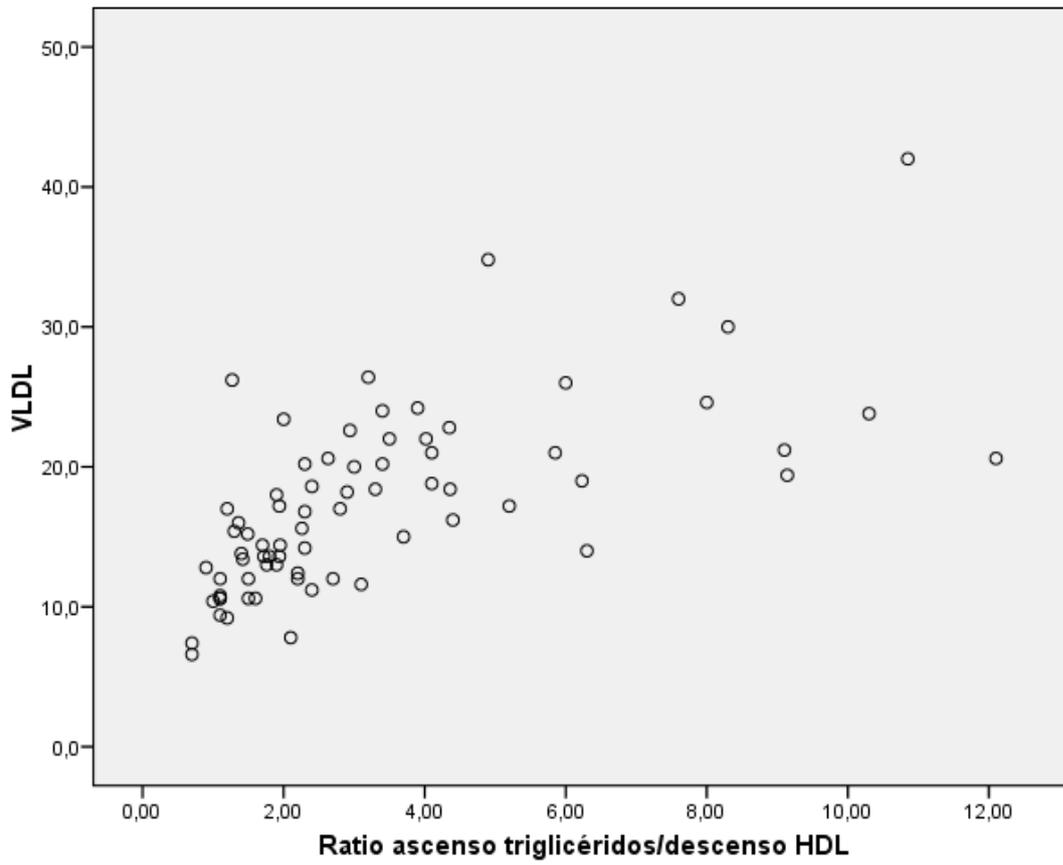
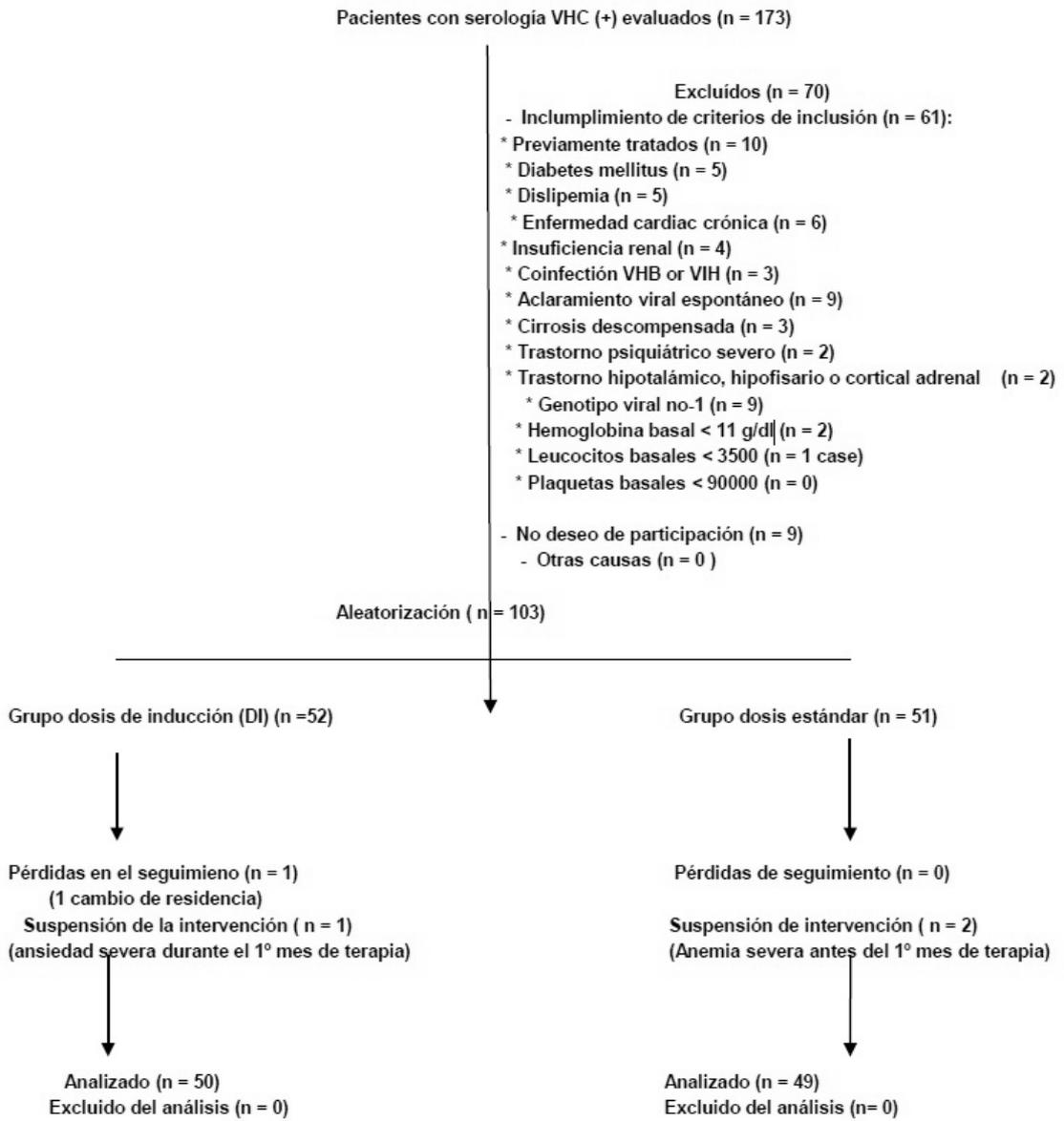


FIG.4



ES 2 507 340 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
UNIVERSIDAD DE HUELVA

<120> Método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento con biterapia estándar (interferón pegilado + ribavirina) en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 (HCC-G1).

<130> P-06315

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 52

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polimorfismo IL-28B rs12979860

<400> 1

ctgaaccagg gagctccccg aaggcgygaa ccagggttga attgcactcc gc
52

<210> 2

<211> 52

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polimorfismo IL-28B rs14158

<220>

<221> Car_misclánea

<222> (27)..(27)

<223> n i s a , c , g , t o r u

<400> 2

cccagaacc ttctgagac ctgcgngcc ttgttttatt caaagacaga ga
52



- ②¹ N.º solicitud: 201330522
②² Fecha de presentación de la solicitud: 12.04.2013
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61B5/00** (2006.01)
G01N33/533 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JURCZYK K et al. Risk score based PEG Interferon alpha 2b and Ribavirin treatment response estimation model for genotype 1 chronic hepatitis C patients. Advances in Medical Sciences 20111201 Medical University of Bialystok pol 01.12.2011 VOL: 56 No: 2 Págs: 165-171 ISSN 1896-1126 (print) ISSN 1898-4002 (electronic) Doi: doi:10.2478/v10039-011-0056-5.	1-20
X	NEUKAM K et al. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin in HIV/hepatitis C virus (HCV)-coinfected patients using HCV genotype, IL28B variations, and HCV-RNA load. Journal of Hepatology 2012 Elsevier nld (04.2012) VOL: 56 No: 4 Págs: 788-794 ISSN 0168-8278 (print) Doi: doi:10.1016/j.jhep.2011.11.008.	1-20
X	NEUKAM K et al. A model to predict the response to therapy against hepatitis C virus (HCV) including low-density lipoprotein receptor genotype in HIV/HCV-coinfected patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2013 Oxford University Press gbr (04.2013) VOL: 68 No: 4 Págs: 915-921 ISSN 0305-7453 (print) ISSN 1460-2091 (electronic) Doi: doi:10.1093/jac/dks488.	1-20
X	CHANG K -C et al. A novel predictive score for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C after sustained response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012 Oxford University Press gbr (11.2012) VOL: 67 No: 11 Págs: 2766-2772 ISSN 0305-7453 (print) ISSN 1460-2091 (electronic) Doi: doi:10.1093/jac/dks269.	1-20
X	O'BRIEN et al. An IL28B Genotype-Based Clinical Prediction Model for Treatment of Chronic Hepatitis C. PLoS One JUL 8 2011 (07.2011) VOL: 6 No: 7 Págs: Article No.: e20904 ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0020904.	1-20
X	RAMON VIDAL-CASTINEIRA JOSE et al. A predictive model of treatment outcome in patients with chronic HCV infection using IL28B and PD-1 genotyping. Journal of Hepatology JUN 2012 (06.2012) VOL: 56 No: 6 Págs: 1230-1238 ISSN 0168-8278.	1-20

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
26.09.2014

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

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

A61B, G01N

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, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.09.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones 12-20	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-20	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JURCZYK K et al. Risk score based PEG Interferon alpha 2b and Ribavirin treatment response estimation model for genotype 1 chronic hepatitis C patients. Advances in Medical Sciences 20111201 Medical University of Bialystok pol 01.12.2011 VOL: 56 No: 2 Págs: 165-171 ISSN 1896-1126 (print) ISSN 1898-4002 (electronic) Doi: doi:10.2478/v10039-011-0056-5.	01.12.2011
D02	NEUKAM K et al. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin in HIV/hepatitis C virus (HCV)-coinfected patients using HCV genotype, IL28B variations, and HCV-RNA load. Journal of Hepatology 2012 Elsevier nld (04.2012) VOL: 56 No: 4 Págs: 788-794 ISSN 0168-8278 (print) Doi: doi:10.1016/j.jhep.2011.11.008.	31.03.2012
D03	NEUKAM K et al. A model to predict the response to therapy against hepatitis C virus (HCV) including low-density lipoprotein receptor genotype in HIV/HCV-coinfected patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2013 Oxford University Press gbr (04.2013) VOL: 68 No: 4 Págs: 915-921 ISSN 0305-7453 (print) ISSN 1460-2091 (electronic) Doi: doi:10.1093/jac/dks488.	31.03.2013
D04	CHANG K -C et al. A novel predictive score for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C after sustained response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012 Oxford University Press gbr (11.2012) VOL: 67 No: 11 Págs: 2766-2772 ISSN 0305-7453 (print) ISSN 1460-2091 (electronic) Doi: doi:10.1093/jac/dks269.	31.10.2012
D05	O'BRIEN et al. An IL28B Genotype-Based Clinical Prediction Model for Treatment of Chronic Hepatitis C. PLoS One JUL 8 2011 (07.2011) VOL: 6 No: 7 Págs: Article No.: e20904 ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0020904.	30.06.2011
D06	RAMON VIDAL-CASTINEIRA JOSE et al. A predictive model of treatment outcome in patients with chronic HCV infection using IL28B and PD-1 genotyping. Journal of Hepatology JUN 2012 (06.2012) VOL: 56 No: 6 Págs: 1230-1238 ISSN 0168-8278.	31.05.2012

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 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 con hepatitis crónica C combinando varios biomarcadores.

D01 divulga un algoritmo práctico y sencillo para la evaluación prospectiva de la respuesta al tratamiento con PEG interferón / ribavirina en personas con hepatitis C crónica (HCC) basándose en los factores de riesgo definidos con anterioridad a la iniciación del tratamiento. Se seleccionaron treinta y seis factores relacionados con una respuesta virológica sostenida (SVR), que se midieron y se compararon de forma rutinaria antes de iniciar el tratamiento. De este grupo se seleccionaron los factores de riesgo con valor predictivo más alto de fracaso del tratamiento. Se definieron valores de corte con significación estadística para cada parámetro, se asignaron puntuaciones de riesgo (RS) y se calcularon y compararon en el grupo con y sin la respuesta virológica sostenida (SVR). Se identificaron siete factores relacionados con el fracaso del tratamiento: VHC > 600.000 UI / L, recuento de plaquetas de la sangre <150000 / ul, GGTP > 45 UI / ml, la proteína total en suero <7,8 g / dl, la glucemia > 105 mg / dl, y los anticuerpos IgG HBC detectables y cirrosis.

El método de la invención comprendido en las reivindicaciones 1-11 difiere de D01 en los marcadores medidos y en que son medidos en momentos distintos, de forma que:

- Se calcula el valor de los parámetros: IP-10, cortisol basal, polimorfismo genético de la Interleukina 28B (IL28B), todo ello identificado a T0. El aclaramiento de la creatina a T0, T1 Y T2, la carga viral (RNA-VHC) a T0, T1, T2, T3 y T4 y determinación de las lipoproteínas: LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos.
- Se utilizan las puntuaciones en las escalas obtenidas para elaborar unos índices: Week y Month

El efecto técnico producto de esa diferencia sería la discriminación de los pacientes que realmente van a poder curarse. Luego el problema técnico que resuelve la invención sería la provisión de un método pronóstico para la discriminación de pacientes con hepatitis C con respuesta o sin respuesta al tratamiento de interferón pegilado + ribavirina, basado en puntuaciones asignados a marcadores. La solución provista por el método de las reivindicaciones 1-11 es la elaboración del panel de biomarcadores y la asignación de puntuaciones (scores) a los mismos, en distintos tiempos, para el cálculo de índices que permitan decidir sobre la continuidad o la suspensión del tratamiento de forma precoz.

D01 asigna una puntuación de riesgo bajo (0-2) a una alta probabilidad de éxito del tratamiento, mientras que una puntuación > 3 se asocia a un fracaso del tratamiento, concluyendo que el modelo presentado es una herramienta simple para la predicción del éxito del tratamiento para el uso clínico antes de iniciar el tratamiento PegIFN / RBV entre genotipo 1 en pacientes con HCC.

D02 desarrolla un algoritmo de predicción basado en el genotipado de la interleuquina 28B (IL28B), el genotipo del virus de la hepatitis C (VHC), y la carga plasmática de carga de ARN-VHC.

D03 desarrolla el método de predicción haciendo uso de los parámetros de la tabla 1.

D04 analiza el nivel de alfa-fetoproteína, el recuento de plaquetas y el estado fibrótico del paciente para elaborar el algoritmo

D05 desarrolla otro algoritmo basándose en el genotipado del IL28B rs12979860-CC, el ARN del VHC (log10 IU / ml), la relación AST:ALT, y el índice de fibrosis de Ishak.

D06 analiza el genotipo para PD-1 y los polimorfismos IL28B, el gen del receptor similares a inmunoglobulina asesinas (KIR) y los genes HLA.

Dado que todos los documentos del estado de la técnica consiguen discriminar a los pacientes que responderán al tratamiento con interferon pegilado + ribavirina, basado en la asignación de puntuaciones a diversos marcadores, el método de las reivindicaciones 1-11 equivaldría a una alternativa a los métodos existentes, que cumpliría con el requisito de novedad, según se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986, pero que carecería de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986, puesto que el efecto técnico no supone una aportación al estado de la técnica.

Las reivindicaciones 12-20 carecerían de novedad y actividad inventiva puesto que el experto en la materia conocería los reactivos y elemento necesarios para detectar los marcadores del que hace el uso el método de las reivindicaciones 1-11. Así pues, tales reivindicaciones no cumplirían con lo mencionado en los arts. 6, 8 de la ley 11/1986.