

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 153**

21 Número de solicitud: 201430205

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

17.02.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.09.2015

Fecha de la concesión:

08.08.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

16.08.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070104

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (56.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES;
UNIVERSIDAD DE GRANADA (19.0%) y
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED (CIBER) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SALMERÓN ESCOBAR, Javier;
MUÑOZ DE RUEDA, Paloma;
QUILES PÉREZ, Rosa;
MUÑOZ GÁMEZ, José Antonio;
PAVÓN CASTILLERO, Esther José;
GILA MEDINA, Ana;
LÓPEZ NEVOT, Miguel Ángel;
CASADO RUIZ, Jorge;
RUIZ EXTREMERA, Ángeles;
MARTÍN ÁLVAREZ, Ana Belén;
CARAZO GALLEGO, Ángel y
LEÓN LÓPEZ, Josefa**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Polimorfismos para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral**

57 Resumen:

Polimorfismos para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral.

Método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301, kit o dispositivo y sus usos.

ES 2 546 153 B1

DESCRIPCIÓN

Polimorfismos para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral.

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 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301, estudiando la variabilidad genética del epítipo inmunodominante NS3 del virus de la hepatitis C (VHC).

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus de la hepatitis C (VHC) es una de las causas más frecuentes de hepatitis viral crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular, siendo la indicación más común para el trasplante hepático (Lauer *et al.*, 2001. *N. Engl. J. Med.* 345 (1), 41-52).

Actualmente, la terapia más común consiste en una combinación de interferón pegilado alfa (IFN-peg) y ribavirina (RBV), que logra una tasa de respuesta del 48-88% (Poynard *et al.*, 2003. *Lancet* 362, 2095-2100).

Se cree que tanto el huésped como el virus, incluyendo regiones genómicas virales, son de importancia a la hora de generar una respuesta eficaz al tratamiento antiviral (Feld *et al.*, 2005. *Nature* 436: 967-972). De esta forma, la respuesta al tratamiento depende del genotipo del virus, ya que algunas variedades del virus son resistentes al tratamiento (Hnatyszyn, 2005. *Antivir. Ther.* 10, 1-11) y además, los pacientes infectados con un mismo genotipo, tienen respuesta al tratamiento variable, lo que indica que otros factores como la IL28B o los antígenos leucocitarios humanos (HLA) podrían influenciar en la respuesta a la terapia antiviral (Ali *et al.*, 2010. *Journal of General Virology* 91, 1931-1938).

Determinados trabajos muestran que la respuesta celular inmune al VHC implica a las células T CD4⁺ (Nascimbeni *et al.*, 2003. *J. Virol.* 77, 1107-1124). Se ha comprobado que los individuos presentan un aclaramiento viral gracias a la estimulación del sistema inmune debido a la respuesta que desencadenan proteínas no estructurales del virus (NS3, NS4 y NS5). Concretamente, NS3 provoca una respuesta mayor (Lloyd *et al.*, 2007 *Immunol. Cell Bio.* 85, 24-32; Fanning *et al.*, 2001. *Hum. Immunol.* 65, 745-751). Además, los pacientes con el VHC genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301 tienen una mayor

proliferación de células CD4⁺, desencadenado por la unión del alelo DQB1*0301 a su epítipo inmunomodulador altamente conservado, situado en la región NS3 del VHC (Lamonaca *et al.*, 1999. *Hepatology* 30(4),1088-1098; Diepolder *et al.*, 1997. *J Virol.* 71, 6011-6019).

- 5 Aún así, todos los pacientes que presentan el alelo HLA-DQB1*0301 no tienen una RVS al tratamiento viral combinado. Por tanto, se podría deber a modificaciones (mutaciones) en el epítipo inmunodominante de la región NS3 del virus que hacen que el reconocimiento con el HLA no se produzca de manera óptima.

- 10 Se conoce que los epítipos inmunodominantes son potenciales candidatos para el estudio de las relaciones virus-huésped y el diseño de agentes terapéuticos basados en la estimulación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Lang *et al.*, 2008. *Vaccine* 26, 6225-6231; Gerlach *et al.*, 2005. *J. Virol.* 79, 12425-12433).

- 15 El 23% de los pacientes de nuestra población con Hepatitis Crónica C presentan el alelo HLA-DQB1*0301 (Muñoz de Rueda *et al.*, 2011. *Am. J. Gastroenterol.* 106(7), 1246-54). Por tanto, se podría plantear un estudio del papel que juega la variabilidad genética del epítipo inmunodominante del VHC en la resistencia al tratamiento antiviral combinado en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA de clase II DQB1*0301, que permita predecir o pronosticar la respuesta.

- 20 Este estudio solo beneficiaría a un determinado porcentaje de la población, pero además que supondría un ahorro en el gasto sanitario, sería una contribución más al campo de los tratamientos personalizados para distintas poblaciones de pacientes infectados por el VHC que son difíciles de tratar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 25 Los autores de la presente invención han localizado una serie de mutaciones que son útiles para determinar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en individuos con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301.

- 30 Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de las mutaciones L5P, L7P y/o L15S del epítipo inmunodominante de la región NS3 para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301.

En una realización preferida, el uso de las mutaciones L5P, L7P y L15S es simultáneo.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante primer método de la invención, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que
5 presentan el alelo HLA-DQB1*0301 que comprende:

i) obtener una muestra biológica aislada de un individuo

ii) detectar la presencia de la mutación: L5P en el epítipo inmunodominante de la región NS3 del virus de la hepatitis C.

iii) asignar al individuo al grupo de pacientes no respondedores con no respuesta viral
10 sostenida (no-RVS) si se detectan los polimorfismos descritos en ii) comparándolos con una muestra control.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el paso ii) además comprende la detección de la mutación L7P

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el paso ii) además
15 comprende la detección de L15S

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el paso ii) comprende la detección de las mutaciones L5P, L7P Y L15S de manera simultánea.

En otra realización preferida, la muestra biológica es una muestra de suero sanguíneo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección de las mutaciones
20 se realiza por técnicas de PCR o técnicas inmunológicas

En otra realización preferida, la detección de las mutaciones aminoacídicas se realiza mediante secuenciación directa.

En otra realización aún más preferida, la detección de las mutaciones se realiza por pirosecuenciación.

25 Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a el uso de una composición farmacéutica que comprende interferón pegilado, ribavirina, y un inhibidor de proteasa del virus de la hepatitis C, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo del grupo de pacientes no respondedores clasificados por el método de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C se selecciona de la lista que comprende Boceprevir y Telaprevir.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1.

- 5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo además comprende las secuencias nucleotídica SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO:4, o cualquier combinación de las mismas.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1.

- 10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray además comprende las secuencias nucleotídica SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:4, o cualquier combinación de las mismas.

- Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo, de la micromatriz, o el microarray de la invención, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301.
- 15

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

- 20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible comprende al menos una secuencia comprendida en las sondas de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

- En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una secuencia conocida o un ARNm comprendido cualquiera de las sondas de la invención.
- 25

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Haplotipos asociados a la No-RVS. La técnica de pirosecuenciación ha revelado la existencia de tres haplotipos que sólo están presentes en los pacientes con no-RVS (no-RVS= 4/16; RVS: 0/21; $p=0.02$), identificados como haplotipo 7, 11 y 15, los cuales muestran un cambio de aminoácido en la posición 5 (aa5, L5P), 7 (aa7, L7P) y 15 (aa15, L15S) respectivamente.

Figura 2. Porcentaje de lecturas de haplotipos por cada muestra. Haplotipos con un % de lectura inferior al 2% no aparecen en la figura.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han analizado las mutaciones del epítipo inmunodominante del VHC en individuos con alelo HLA-DQB1*0301 y han generado un método de predicción o pronóstico de no-RVS de los pacientes con tratamiento antiviral de interferón pegilado más ribavirina).

15 La presente invención se refiere a un método y a un kit o dispositivo para su uso en la predicción o pronóstico de la no-RVS en pacientes con VHC.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de las mutaciones L5P, L7P y/o L15S del epítipo inmunodominante de la región NS3, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301.

En una realización preferida, el uso de las mutaciones L5P, L7P y L15S es simultáneo.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante primer método de la invención, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301 que comprende:

i) obtener una muestra biológica aislada de un individuo

ii) detectar la presencia de la mutación: L5P en el epítipo inmunodominante de la región NS3 del virus de la hepatitis C.

iii) asignar al individuo al grupo de pacientes no respondedores con no respuesta viral sostenida (no-RVS) si se detectan los polimorfismos descritos en ii) comparándolos con una muestra control.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el paso ii) además comprende la detección de la mutación L7P

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el paso ii) además comprende la detección de L15S

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el paso ii) comprende la detección de las mutaciones L5P, L7P Y L15S de manera simultánea.

10 En el caso de la invención, el epítipo inmunodominante corresponde a la región NS3, concretamente a la región que comprende del aa 1253 al 1272, del VHC.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es una muestra de suero sanguíneo.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección de las mutaciones se realiza por técnicas de PCR o técnicas inmunológicas.

En otra realización preferida, la detección de las mutaciones aminoacídicas se realiza mediante secuenciación directa.

En otra realización aún más preferida, la detección de las mutaciones se realiza por pirosecuenciación.

20 Los pasos (ii) y/o (iii) del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la presencia en el paso (ii) o la clasificación computerizada en el paso (iii).

25 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 de un individuo del paso (i) es suero sanguíneo.

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

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación del resultado de la amplificación de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una amplificación de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (iii) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “PCR” corresponde a las siglas de reacción en cadena de la polimerasa mediante la cual se pueden obtener millones de copias de las regiones de ADN deseadas. Se caracteriza por el empleo de parejas de cebadores que acotan la región de la que se realizarán millones de copias, lo que también se conoce como "amplificar ADN" durante la PCR. La PCR está compuesta por un número determinado de ciclos, compuestos a su vez por tres fases en las que las hebras de ADN se separan, se unen los cebadores y se elongan las nuevas hebras de ADN. En cada ciclo, si la eficiencia de la reacción es del 100% se produce un crecimiento exponencial de los fragmentos de ADN objeto de la amplificación.

En el caso de la invención, el término “pirosecuenciación” es una tecnología de secuenciación masiva, aplicable a genomas completos mediante luminiscencia. Se caracteriza por utilizar una placa multipocillo que permite transmitir la luz producida por quimioluminiscencia durante la reacción de secuenciación hasta una cámara de captación de imágenes. Normalmente, se utiliza para secuenciar de 500-1000 nucleótidos por pocillo. Cada fragmento se amplifica hasta 10 millones de veces y se detecta la señal. No es necesario el empleo de geles ni marcadores fluorescentes o ddNTPs.

Por “HLA o antígenos leucocitarios humanos” en esta memoria, se entiende los antígenos formados por moléculas que se encuentran en la superficie de casi todas las células de los tejidos de un individuo, y incluyendo los leucocitos de la sangre. Este conjunto de moléculas están implicadas en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario. Concretamente, el grupo “HLA-DQ” constituye un grupo de unos 50 antígenos que pueden encontrarse en el lugar HLA-DQ.

Por “virus” en esta memoria, se entienden todos los agentes infecciosos microscópicos acelulares que solo pueden multiplicarse dentro de las células de otros organismos.

El VHC pertenece al género *Hepacivirus*, que se engloba dentro del Dominio *Acytota*, Grupo IV: Virus ARN monocatenario positivo, Familia *Flaviviridae*.

La familia *Flaviviridae* es una familia de virus propagados principalmente por vectores artrópodos. Incluye los géneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pestivirus*. Estos virus contienen un genoma de ARN monocatenario positivo, su genoma es lineal, no segmentado y con una longitud de 9,6 a 12,3 kb. Las partículas virales presentan envoltura y son esféricas, de
5 alrededor de 40-60 nm de diámetro. Las principales enfermedades que causan los virus de esta familia son: Dengue, encefalitis japonesa, enfermedad de Kyasanur, encefalitis del Valle de Murray, encefalitis de San Luis, meningoencefalitis de garrapata, encefalitis del Nilo, fiebre amarilla y hepatitis C.

Concretamente, la proteína NS3 del VHC, también llamada p70, es una proteína no
10 estructural del virus, que tiene un peso molecular de 70 kDa. Posee tres actividades enzimáticas: actividad serino proteasa, localizada en un tercio de NS3, hacia el extremo N-terminal y posee un potencial catalítico trivalente, similar a la tripsina. La actividad helicasa-nucleósido trifosfatasa fue identificada en la mitad del extremo C-terminal de la proteína NS3, y está involucrada en la replicación y posiblemente en la traducción del genoma viral
15 (Jin y Peterson, 1995. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 323, 47-53).

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

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

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

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

- 5 La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1H-1, 2,4-triazol-3-carboxamida) es un nucleótido sintético análogo de la guanidina, con propiedades antivirales y actividad inmunorreguladora. Fue una de las primeras drogas que demostró su eficacia para reducir la capacidad de reproducción de virus. Está descrita en el Índice Merck, compuesto N ° 8199, undécima edición. Su fabricación y formulación se describen en la patente de EE.UU. n. No. 4.211.771.
- 10 La rápida captación eritrocitaria de la ribavirina y su fosforilación son responsables de la importante anemia hemolítica dependiente de la dosis. Con el fin de evitar este efecto indeseado, el diseño de los nuevos fármacos contempla que no sean captados o fosforilados por los eritrocitos o que sean captados rápidamente y fosforilados en el hígado. Ambos enfoques tienen la desventaja potencial de que pueden anular pasos fundamentales
- 15 que contribuyen con la eficacia terapéutica de la ribavirina.

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

La viramidina es un profármaco de la RBV, en el hígado se convierte en RBV por acción de la adenosindeaminasa hepática. La RBV y viramidina son rápidamente eliminadas, sus moléculas y los metabolitos son excretados por el riñón y tienen una Tmax de 1,5-3 h.

- 20 Experimentalmente, la retención hepática de la RBV derivada de una dosis oral de viramidina es 3 veces mayor que la RBV oral. En cambio, la concentración de fosfatos de RBV en los hematíes es mucho menor, de ahí que se pueda mantener una concentración más estable de hemoglobina. Es un fármaco seguro y se tolera bien. Los efectos adversos con dosis de 200, 600 y 1.200 mg fueron: 0, 26 y 50%, respectivamente; la mayoría leves y
- 25 desaparecieron sin secuelas.

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

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

- 30 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.

En una realización preferida de la invención, el inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C es boceprevir. En otra realización preferida de la invención, el inhibidor de la proteasa del virus es telaprevir.

5 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.

10 Se denomina "carga viral plasmática 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} IU/ml].

Para el pronóstico se considera que a mayor carga viral basal, menor probabilidad de una respuesta sostenida. La respuesta al tratamiento antiviral se evalúa con una carga viral 15 basal (pre-tratamiento) y al menos una carga viral al término de éste y a las 24 semanas post tratamiento. Se considera una respuesta al tratamiento antiviral si se obtiene una carga viral indetectable al término del tratamiento y una carga viral indetectable y/o ARN cualitativo negativo a las 24 semanas (respuesta viral sostenida). Igualmente se ha determinado que una caída de la carga viral temprana (respuesta viral precoz), con descenso de 2 \log_{10} 20 UI/ml o más a las 12 semanas intra-tratamiento, permite evaluar anticipadamente la probabilidad de obtener una respuesta virológica sostenida al término de la terapia.

En la presente invención "pronóstico" se entiende como la evolución esperada de una enfermedad y se refiere a la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad así como a la valoración de su inicio, estado de desarrollo, evolución, o de 25 su regresión, y/o el pronóstico del curso de la enfermedad en el futuro. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es 30 estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba *t* de *Student*, prueba de *Mann-Whitney*, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%,

al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

Por "predicción de la respuesta" se entiende, en el contexto de la presente invención, la determinación de la probabilidad de que el paciente responda de forma favorable o desfavorable a una terapia o a un tratamiento determinado. Especialmente, el término "predicción", como se usa aquí, se refiere a una evaluación individual de cualquier parámetro que pueda ser útil en determinar la evolución de un paciente. Como entenderán los expertos en la materia, la predicción de la respuesta clínica al tratamiento, aunque se prefiere que sea, no necesita ser correcta para el 100% de los sujetos a ser diagnosticados o evaluados. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos como que tienen una probabilidad aumentada de tener una respuesta positiva. El experto en la materia puede determinar fácilmente si un sujeto es estadísticamente significativo usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de los valores de p , prueba t de Student, prueba de Mann Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 50%>, al menos del 60%>, al menos del 70%>, al menos del 80%>, al menos del 90%), al menos del 95%>. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1 ó 0,05. La predicción de la respuesta clínica se puede hacer utilizando cualquier criterio de valoración usado y conocido por el experto en la materia.

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 o tratamiento adecuados. Esta discriminación tal y como es 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 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 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.

En una realización preferida las secuencias nucleotídicas o sondas usadas para la detección de las mutaciones son:

- 5 a) SEQ ID NO: 1: CAA GTG GCA CAT CTA CAC GCG CCC ACA GG
- b) SEQ ID NO: 2: TGG CAC TCA TCA CAT ATT ATG ATG TCA TAG GC
- c) SEQ ID NO: 3: GGG AAG AGT ACT AAG GTG CCG GCT GCG TAT GC
- d) SEQ ID NO: 4: CAA CCA CCG TCA GCT AGG AAC TTG CCG TAT GT

10 En una realización preferida se realiza una PCR anidada, donde las sondas (externas) de la primera PCR corresponden a las SEQ ID NO:1 (sentido) y SEQ ID NO:2 (antisentido), y las sondas (internas) de la segunda PCR corresponden a las SEQ ID NO:3 (sentido) y SEQ ID NO:4 (antisentido).

15 En el contexto de la presente invención, la "PCR anidada" es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica.

20 En el contexto de la presente invención, el término "sonda" se define como un oligonucleótido que es complementario o sustancialmente complementario a la secuencia del amplicón, dentro de los límites de los cebadores. En la presente forma de realización preferida, la sonda de captura no se encuentra provista de la adición de una cola, pero podría añadirse una cola, con desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. La sonda se puede
25 producir preferiblemente sintéticamente o como un subconjunto de ADN obtenido naturalmente, preparados por metodologías estándar (por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante digestión por endonucleasas de restricción o síntesis directa).

Por lo tanto, no existe, excepto para la función pretendida, ninguna diferencia fundamental entre un "oligonucleótido" o una "sonda" según la invención.

Así, las sondas pueden ser de entre 10 y 200 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 12 y 50 nucleótidos, y aún más preferiblemente del número de nucleótidos de las sondas de la invención.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a el uso de una composición farmacéutica que comprende interferón pegilado, ribavirina, y un inhibidor de proteasa del virus de la hepatitis C, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo del grupo de pacientes no respondedores clasificados por el método de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C se selecciona de la lista que comprende Boceprevir y Telaprevir.

10 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo además comprende las secuencias nucleotídica SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO:4, o cualquier combinación de las mismas.

15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo además comprende los elementos necesarios para detectar el alelo HLA-DQB1*0301.

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

20 Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

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

alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1.

- 5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray además comprende las secuencias nucleotídica SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:4, o cualquier combinación de las mismas.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray además comprende los elementos necesarios conocidos para detectar el alelo HLA-DQB1*0301.

- 10 Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie de un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La
15 fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas pueden ser de entre 10 y 200 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 12 y 50 nucleótidos, y aún más preferiblemente del número de nucleótidos de las sondas de la invención.

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

- 25 Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo, de la micromatriz, o el microarray de la invención, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301.

- 30 Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible comprende al menos una secuencia comprendida en las sondas de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible además comprende los elementos necesarios para detectar el alelo HLA-DQB1*0301.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una secuencia conocida o un ARNm comprendido cualquiera de las sondas de la invención.

10 Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo
15 nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

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

25 Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de
30 apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N⁶-metil-adenina, N⁶-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-

(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)_w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

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

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.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Material y métodos

Se ha pirosecuenciado el epítipo inmunodominante NS3 (aa 1253-1272) del VHC (Figura 1), mediante el ultrasecuenciador FLX 454 (Roche S.L.), de 37 pacientes: 21 con Respuesta Viroológica Sostenida (RVS), 6 Recidivantes (RC) y 10 No respondedores (NR). Los pacientes RC y NR se han considerado no-RVS. Se ha realizado un estudio de: 1) Número

de quasiespecies (haplotipos) por muestra; 2) Número de mutaciones por quasiespecies (haplotipos); y 3) Número de sitios polimórficos.

Resultados

Se ha realizado una media de lectura de 18.197,7 secuencias (min-max: 4.815-42.788), con una media de longitud de lectura de 185,54 (min-max: 22-553). Aplicando los controles de calidad, finalmente nos encontramos con 34 quasiespecies diferentes. En la tabla 1 y 2 aparecen el número de quasiespecies (Haplotipos), mutaciones por quasiespecies y de sitios polimórficos por grupo. A pesar de que los pacientes con RVS presentan una media de menos quasiespecies que los no-RVS, no encontramos diferencias significativas. En la figura 1 se representa el número de haplotipos (quasiespecies) por muestra, y en la tabla 3 de manera pormenorizada (resultados de la pirosecuenciación). Sin embargo observamos que los pacientes con RVS tienen menor número de mutaciones por quasiespecies, y menor número de sitios polimórficos que los No-RVS ($P=0,01$ y $P=0,02$, respectivamente). En la tabla 4 se expone el porcentaje de mutaciones respecto a la secuencia de referencia por muestra secuenciada (resultados de la pirosecuenciación). Estudiando las posiciones del epítipo inmunodominante más susceptibles de encontrarse mutadas y su posible relación con la respuesta, observamos dos posiciones que únicamente se encuentran mutadas en los pacientes con No-RVS, aa 5 (L/P) (Haplotipo 7; Figura 1) y aa 7 (L/P) (Haplotipo 11; Figura 1) (No-RVS= 4/16; RVS: 0/21; en ambos casos), encontrando diferencias estadísticamente significativas en ambos casos ($p=0,02$). Por otro lado, el aa 15 (L/S*) (Haplotipo 15; Figura 1) se encuentra mutado en 2/21 con RVS, y en 7/16 no-RVS, ($P=0,02$). En este último aa 15, 4/16 con no-RVS son L/S, mientras que este cambio no aparece en los pacientes RVS (0/21).

Tabla 1. Estudio mediante pirosecuenciación del epítipo inmunodominante de VHC-NS3 (aa 1253-1272) frente al alelo HLA-DQB1*0301, en pacientes con Hepatitis Crónica C genotipo 1 tratados con IFNpeg/RBV con Respuesta Viroológica Sostenida (RVS), Recidivantes (RC) y No respondedores (NR).

	RVS (n=21)	RC (n=6)	NR (n=10)	p
Número de quasiespecies	2,19 ± 0,2	5,17 ± 2,3	4,5 ± 1,3	n.s.
Número de mutaciones / quasiespecies	0,48 ± 0,1	1,24 ± 0,7	1,24 ± 0,8	0,03
Número de sitios polimórficos	1,43 ± 0,3	4,5 ± 1,9	4,6 ± 1,3	n.s.

Tabla 2. Estudio mediante pirosecuenciación del epítipo inmunodominante de VHC-NS3 (aa 1253-1272) frente al alelo HLA-DQB1*0301, en pacientes con Hepatitis Crónica C genotipo 1 tratados con IFNpeg/RBV con Respuesta Viroológica Sostenida (RVS) frente a no-RVS (RC+NR)

	RVS (n=21)	No-RVS (n=16)	p
Número de quasiespecies	2,19 ± 0,2	4,75 ± 1,1	n.s.
Número de mutaciones/ quasiespecies	0,48 ± 0,1	1,24 ± 0,6	0,01
Número de sitios polimórficos	1,43 ± 0,3	4,56 ± 1	0,02

5

Tabla 3. Haplotipos encontrados por muestra secuenciada. Cada haplotipo lleva su identificación y número de lecturas encontradas por pirosecuenciación.

Pacientes RVS	Haplotipos encontrados por muestra y %
Muestra 26	GYKVLVLDPSVAATLGFGAY haplo9 Muestra26 166 1.37
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 26 11919 98.32
Muestra 27	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 27 5775 99.6
Muestra 29	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 29 11862 94.93
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 29 51 0.41
Muestra 30	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 30 92 0.67
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 30 12964 94.6
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 30 60 0.44

Muestra 31	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 31 54 0.35
	GYKVLVLNPSVATTGFGAY haplo27 Muestra 31 60 0.39
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 31 14526 94.55
Muestra 32	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 32 15753 94.48
	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 32 68 0.41
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 32 57 0.34
Muestra 33	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 33 21590 97.14
	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 33 50 0.22
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 33 79 0.36
	GYEVLVLNPSVAATLGFGAY haplo3 Muestra 33 60 0.27
Muestra 34	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 34 15584 95.82
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 34 56 0.34
Muestra 35	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 35 11900 99.68
Muestra 37	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 37 10454 97.85
Muestra 38	GYKVLVLNPSVATTGFGAY haplo27 Muestra 38 50 0.24
	GYKVLVLNLSVAATLGFGAY haplo13 Muestra 38 82 0.4
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 38 19289 94.28

	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 38 96 0.47
	GYKVLVLSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 38 59 0.29
Muestra 39	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 39 4953 99.42
Muestra 40	GYKVLVLNPSVASTLGFGAY haplo31 Muestra 40 128 0.75
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 40 15713 92.16
	GYKVLVLNPSVTATLGFGAY haplo32 Muestra 40 84 0.49
	GYKVLVLDPSVAATLGFGAY haplo9 Muestra 40 56 0.33
	GYKVLVLNPSVAATLGSGAY haplo33 Muestra 40 67 0.39
Muestra 41	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 41 50 0.34
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 41 13744 94.56
	GYKVLVLSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 41 163 1.12
Muestra 42	GYKVPVLNPSVAATLGFGAY haplo7 Muestra 42 77 0.46
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 42 78 0.47
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Sample42 15900 95.16
	GYKVLVLSVAATLGFGAY haplo5 Sample42 110 0.66
Muestra 43	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 43 7592 78.06
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 43 1810 18.61

Muestra 44	GYKVLVLNPSVAATLGFGAH haplo4 Muestra 44 509 9.02
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 44 4875 86.41
Muestra 45	GYKVLVLNPAVAATLGFGAY haplo8 Muestra 45 55 0.26
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 45 21056 99.16
Muestra 46	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 46 9362 99.81
Muestra 47	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 47 6489 99.08
Muestra 48	GYKVLVLNPSVAATLSFGAY haplo30 Muestra 48 236 3.31
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 48 6461 90.54
Muestra 49	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 49 2284 97.32
Muestra 50	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 50 3770 96.67
	GYKVLVLNPSVAATLGCGAY haplo34 Muestra 50 76 1.95
Pacientes RC	
Muestra 1	GYEVLVLNPSVAATLGFGAY haplo3 Muestra 1 65 0.31
	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 1 52 0.25
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 1 19654 94.85
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 1 95 0.46
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAH haplo4 Muestra 1 53 0.26

ES 2 546 153 B1

	GYKVLVLNPSAAATLGFGAY haplo6 Muestra 1 51 0.25
Muestra 4	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 4 11656 96.04
Muestra 7	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 7 6419 97.69
Muestra 8	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 8 6987 96.79
	GYKVLVLNPSVAATLGFEAY haplo21 Muestra 8 181 2.51
Muestra 9	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 9 12945 94.18
	GYKVPVLNPSVAATLGFGAY haplo7 Muestra 9 83 0.6
	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 9 63 0.46
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 9 56 0.41
Muestra 14	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 14 30180 93.95
	GYKVLVLNPSVAATSGFGAY haplo15 Muestra 14 111 0.35
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAC haplo26 Muestra 14 60 0.19
	GYRVLVLNPSVAATLGFGAY haplo10 Muestra 14 63 0.2
	GYEVLVLNPSVAATLGFGAY haplo3 Muestra 14 79 0.25
	GYKALVLNPSVAATLGFGAY haplo24 Muestra 14 72 0.22
	GYKVLVLNPSVATLGFGAY haplo23 Muestra 14 158 0.49
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 14 179 0.56

	GCKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo12 Muestra 14 88 0.27
	GYKVPVLNPSVAATLGFGAY haplo7 Muestra 14 76 0.24
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAH haplo4 Muestra 14 67 0.21
	GYKVLVLNPTVAATLGFGAY haplo25 Muestra 14 69 0.21
	GYKVLVPNPSVAATLGFGAY haplo11 Muestra 14 96 0.3
	GYKVLVLDPSVAATLGFGAY haplo9 Muestra 14 86 0.27
	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 14 53 0.16
	GYKVLVLNPSVATTLGFGAY haplo27 Muestra 14 56 0.17
Muestra 16	GYKVLVLSPSVAAT***** haplo28 Muestra 16 93 0.61
	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 16 10325 67.74
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 16 4197 27.53
	GYKVLALNPSVAAT***** haplo29 Muestra 16 54 0.35
Muestra 17	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 17 133 1.41
	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 17 9169 97.3
Muestra 18	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 18 5392 97.84
Muestra 21	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 21 9609 99.72
Pacientes NR	
Muestra 2	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5

ES 2 546 153 B1

	Muestra 2 134 0.42
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 2 29933 94.1
	RYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo14 Muestra 2 57 0.18
	GYKVLVLNLSVAATLGFGAY haplo13 Muestra 2 59 0.19
	GYKVLVLDPSVAATLGFGAY haplo9 Muestra 2 80 0.25
	GYRVLVLNPSVAATLGFGAY haplo10 Muestra 2 80 0.25
	GYKVLVPNPSVAATLGFGAY haplo11 Muestra 2 77 0.24
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 2 135 0.42
	GYEVLVLNPSVAATLGFGAY haplo3 Muestra 2 71 0.22
	GCKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo12 Muestra 2 59 0.19
	GYKVLVLNPAVAATLGFGAY haplo8 Muestra 2 99 0.31
	GYKVLVLNPSAAATLGFGAY haplo6 Muestra 2 66 0.21
	GYKVLVLNPSVAATSGFGAY haplo15 Muestra 2 53 0.17
	GYKVPVLNPSVAATLGFGAY haplo7 Muestra 2 107 0.34
Muestra 3	GYKVLVLNPSVAATLVFGAY haplo16 Muestra 3 60 0.84
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 3 6711 94.07
Muestra 5	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 5 52 0.39

	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 5 12501 94.12
Muestra 6	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 6 51 0.34
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 6 58 0.39
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 6 14061 93.96
	GYKVLVLNPSVAATSGFGAY haplo15 Muestra 6 63 0.42
	GYKVPVLNPSVAATLGFGAY haplo7 Muestra 6 67 0.45
	GYKVLVPNPSVAATLGFGAY haplo11 Muestra 6 70 0.47
	Muestra 10
Muestra 13	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 13 65 0.4
	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 13 68 0.42
	GYKVLVLNPSVAATSGFGAY haplo15 Muestra 13 66 0.4
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 13 15398 94.01
	GYKVLVLNPSVAATLGLGAY haplo22 Muestra 13 55 0.34
Muestra 11	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 11 71 0.27
	GYKVPVLNPSVAATLGFGAY haplo7 Muestra 11 76 0.29
	GYKVLVLNPPVAATLGFGAY haplo17 Muestra 11 83 0.32
	GYKVLVLNPSVAATSGFGAY haplo15 Muestra 11 54 0.21

ES 2 546 153 B1

	GYKVLVLNPSVAATLGFGAH haplo4 Muestra 11 53 0.2
	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 11 53 0.2
	GYKVLVPNPSVAATLGFGAY haplo11 Muestra 11 72 0.28
	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 11 107 0.41
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 11 24708 94.47
Muestra 12	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 12 9071 85.5
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 12 524 4.94
	GYKVLVLNPSVAATLGFGVY haplo19 Muestra 12 461 4.34
	RYKVLVLNPSVAAT***** haplo20 Muestra 12 122 1.15
Muestra 15	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 15 439 5.32
	GYKVLVLNPSVAAT***** haplo18 Muestra 15 7509 90.99
Muestra 20	GYKVLVLNLSVAATLGFGAY haplo13 Muestra 20 201 3.16
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 20 5938 93.22
Muestra 22	GYKVLALNPSVAATLGFGAY haplo2 Muestra 22 67 0.46
	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Sample22 13740 94.83
	GYKVLVLNPSVAATLSFGAY haplo30 Muestra 22 78 0.54
	GYKVLVLSPSVAATLGFGAY haplo5 Muestra 22 52 0.36

Muestra 23	GYKVLVLNPSVAATLSFGAY haplo30 Muestra 23 4953 93.72
Muestra 24	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 24 5525 91.78
	GYKVLVLNPSVAATLGLGAY haplo22 Muestra 24 261 4.34
Muestra 25	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY haplo1 Muestra 25 9000 94.8

Tabla 4. Porcentaje de mutaciones respecto a la secuencia de referencia por muestra secuenciada. Posición, con respecto a la secuencia de referencia, donde ocurre la mutación en los diferentes haplotipos contenidos por muestras. Nucleótido de referencia y cambio por mutación. Porcentaje de haplotipos en los que ocurren las mutaciones.

	Porcentaje de mutaciones por muestra			
	Posición en secuencia de Referencia	Referencia	Cambio de aminoácido	Número Haplotipo (%)
Pacientes RVS				
Muestra 26	8	N	D	1 (50,0%)
Muestra 29	6	V	A	1 (50,0%)
Muestra 30	6	V	A	1 (33,33%)
	15	L	*	1 (33,33%)
	16	G	*	1 (33,33%)
	17	F	*	1 (33,33%)
	18	G	*	1 (33,33%)
Muestra 31	19	A	*	1 (33,33%)
	8	N	S	1 (33,33%)
Muestra 32	13	A	T	1 (33,33%)
	6	V	A	1 (33,33%)
	8	N	S	1 (33,33%)

Muestra 33	3	K	E	1 (25,0%)
	6	V	A	1 (25,0%)
	8	N	S	1 (25,0%)
Muestra 34	6	V	A	1 (50,0%)
Muestra 38	6	V	A	1 (20,0%)
	8	N	S	1 (20,0%)
	9	P	L	1 (20,0%)
	13	A	T	1 (20,0%)
Muestra 40	8	N	D	1 (20%)
	12	A	T	1 (20%)
	13	A	S	1 (20%)
	17	F	S	1 (20%)
Muestra 41	6	V	A	1 (33,33%)
	8	N	S	1 (33,33%)
Muestra 42	5	L	P	1 (25,0%)
	6	V	A	1 (25,0%)
	8	N	S	1 (25,0%)
Muestra 43	15	L	*	1 (50,0%)
Muestra 44	20	Y	H	1 (50,0%)
Muestra 45	10	S	A	1 (50,0%)
Muestra 48	16	G	S	1 (50,0%)
Muestra 50	17	F	C	1 (50,0%)
Pacientes RC				
Muestra 1	3	K	E	1 (16,67%)
	6	V	A	1 (16,67%)
	8	N	S	1 (16,67%)
	11	V	A	1 (16,67%)
	20	Y	H	1 (16,67%)
Muestra 8	18	G	E	1 (50,0%)
Muestra 9	5	L	P	1 (25,0%)
	6	V	A	1 (25,0%)
	15	L	*	1 (25,0%)
	16	G	*	1 (25,0%)

ES 2 546 153 B1

	17	F	*	1 (25,0%)
	18	G	*	1 (25,0%)
	19	A	*	1 (25,0%)
	20	Y	*	1 (25,0%)
Muestra 14	2	Y	C	1 (6,25%)
	3	K	E	1 (6,25%)
	3	K	R	1 (6,25%)
	4	V	A	1 (6,25%)
	5	L	P	1 (6,25%)
	6	V	A	1 (6,25%)
	7	L	P	1 (6,25%)
	8	N	D	1 (6,25%)
	8	N	S	1 (6,25%)
	10	S	T	1 (6,25%)
	12	A	V	1 (6,25%)
	13	A	T	1 (6,25%)
	15	L	S	1 (6,25%)
	20	Y	C	1 (6,25%)
20	Y	H	1 (6,25%)	
Muestra 16	6	V	A	1 (25,0%)
	8	N	S	1 (25,0%)
	15	L	*	3 (75,0%)
	16	G	*	3 (75,0%)
	17	F	*	3 (75,0%)
	18	G	*	3 (75,0%)
	19	A	*	3 (75,0%)
	20	Y	*	3 (75,0%)
Muestra 17	15	L	*	1 (50,0%)
	16	G	*	1 (50,0%)
	17	F	*	1 (50,0%)
	18	G	*	1 (50,0%)
	19	A	*	1 (50,0%)
	20	Y	*	1 (50,0%)

ES 2 546 153 B1

Pacientes NR				
Muestra 2	1	G	R	1 (7,14%)
	2	Y	C	1 (7,14%)
	3	K	E	1 (7,14%)
	3	K	R	1 (7,14%)
	5	L	P	1 (7,14%)
	6	V	A	1 (7,14%)
	7	L	P	1 (7,14%)
	8	N	D	1 (7,14%)
	8	N	S	1 (7,14%)
	9	P	L	1 (7,14%)
	10	S	A	1 (7,14%)
	11	V	A	1 (7,14%)
	15	L	S	1 (7,14%)
Muestra 3	16	G	V	1 (50,0%)
Muestra 5	6	V	A	1 (50,0%)
Muestra 6	5	L	P	1 (16,67%)
	6	V	A	1 (16,67%)
	7	L	P	1 (16,67%)
	8	N	S	1 (16,67%)
	15	L	S	1 (16,67%)
Muestra 11	5	L	P	1 (11,11%)
	6	V	A	1 (11,11%)
	7	L	P	1 (11,11%)
	8	N	S	1 (11,11%)
	10	S	P	1 (11,11%)
	15	L	S	1 (11,11%)
	15	L	*	1 (11,11%)
	16	G	*	1 (11,11%)
	17	F	*	1 (11,11%)
	18	G	*	1 (11,11%)
	19	A	*	1 (11,11%)
	20	Y	H	1 (11,11%)

	20	Y	*	1 (11,11%)
Muestra 12	1	G	R	1 (25,0%)
	15	L	*	2 (50,0%)
	16	G	*	2 (50,0%)
	17	F	*	2 (50,0%)
	18	G	*	2 (50,0%)
	19	A	V	1 (25,0%)
	19	A	*	2 (50,0%)
	20	Y	*	2 (50,0%)
Muestra 13	6	V	A	1 (20,0%)
	8	N	S	1 (20,0%)
	15	L	S	1 (20,0%)
	17	F	L	1 (20,0%)
Muestra 15	15	L	*	1 (50,0%)
	16	G	*	1 (50,0%)
	17	F	*	1 (50,0%)
	18	G	*	1 (50,0%)
	19	A	*	1 (50,0%)
	20	Y	*	1 (50,0%)
Muestra 20	9	P	L	1 (50,0%)
Muestra 22	6	V	A	1 (25,0%)
	8	N	S	1 (25,0%)
	16	G	S	1 (25,0%)
Muestra 23	16	G	S	1 (100,0%)
Muestra 24	17	F	L	1 (50,0%)

Los pacientes DQB1*0301 que presentan No-RVS, tienen mayor número de mutaciones por quasispecie, y mayor número de sitios polimórficos en su epítipo inmunodominante de VHC (NS3 aa 1253-1272), que los pacientes con RVS, impidiendo su correcta unión a la molécula de HLA-DQB1*0301, y por tanto inhibiendo la proliferación CD4⁺.

ES 2 546 153 B1

El cambio aminoacídico a Prolina podría provocar un cambio conformacional en dicho epítipo que causaría la ausencia de interacción con la hendidura del HLA-DQB1*0301, y por tanto, de la no respuesta inmunológica, explicando la ausencia de RVS.

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso simultáneo de las mutaciones L5P, L7P y L15S del epítipo inmunodominante de la región NS3 para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en paciente con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo
5 HLA-DQB1*0301.
- 2.- El uso según la reivindicación anterior, donde el uso de las mutaciones L5P, L7P y L15S es simultáneo.
- 3.- Un método para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el
10 alelo HLA-DQB1*0301 que comprende:
- i) obtener una muestra biológica aislada de un individuo
 - ii) detectar la presencia de la mutación L5P en el epítipo inmunodominante de la región NS3 del virus de la hepatitis C.
 - iii) asignar al individuo al grupo de pacientes no respondedores con no respuesta viral
15 sostenida (no-RVS) si se detectan los polimorfismos descritos en ii), en comparación con una muestra control.
- 4.- El método según la reivindicación anterior, donde en el paso ii) además comprende la detección de la mutación L7P en el epítipo inmunodominante de la región NS3 del virus de la hepatitis C.
- 20 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde el paso ii) además comprende la detección de la mutación L15S en el epítipo inmunodominante de la región NS3 del virus de la hepatitis C.
- 6.- El método según las reivindicaciones 3-5, donde la muestra biológica es una muestra de suero sanguíneo.
- 25 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde la detección de las mutaciones se realiza por técnicas de PCR o por técnicas inmunológicas.
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, donde la detección de las mutaciones se realiza por secuenciación directa.

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde la detección de las mutaciones se realiza por pirosecuenciación.

10.- El uso de una composición farmacéutica que comprende interferón pegilado, ribavirina, y un inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo del grupo de pacientes no respondedores clasificado por un método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9.

11.- El uso de una composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C se selecciona de la lista que comprende boceprevir y telaprevir.

10 12.- Un Kit o dispositivo que comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1

13.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que además comprende una secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

14.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, que además comprende una secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3.

15 15.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que además comprende una secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4.

16.- El uso del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral con interferón pegilado más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 que presentan el alelo HLA-DQB1*0301 y/o detectar en un individuo el alelo HLA-DQB1*0301.

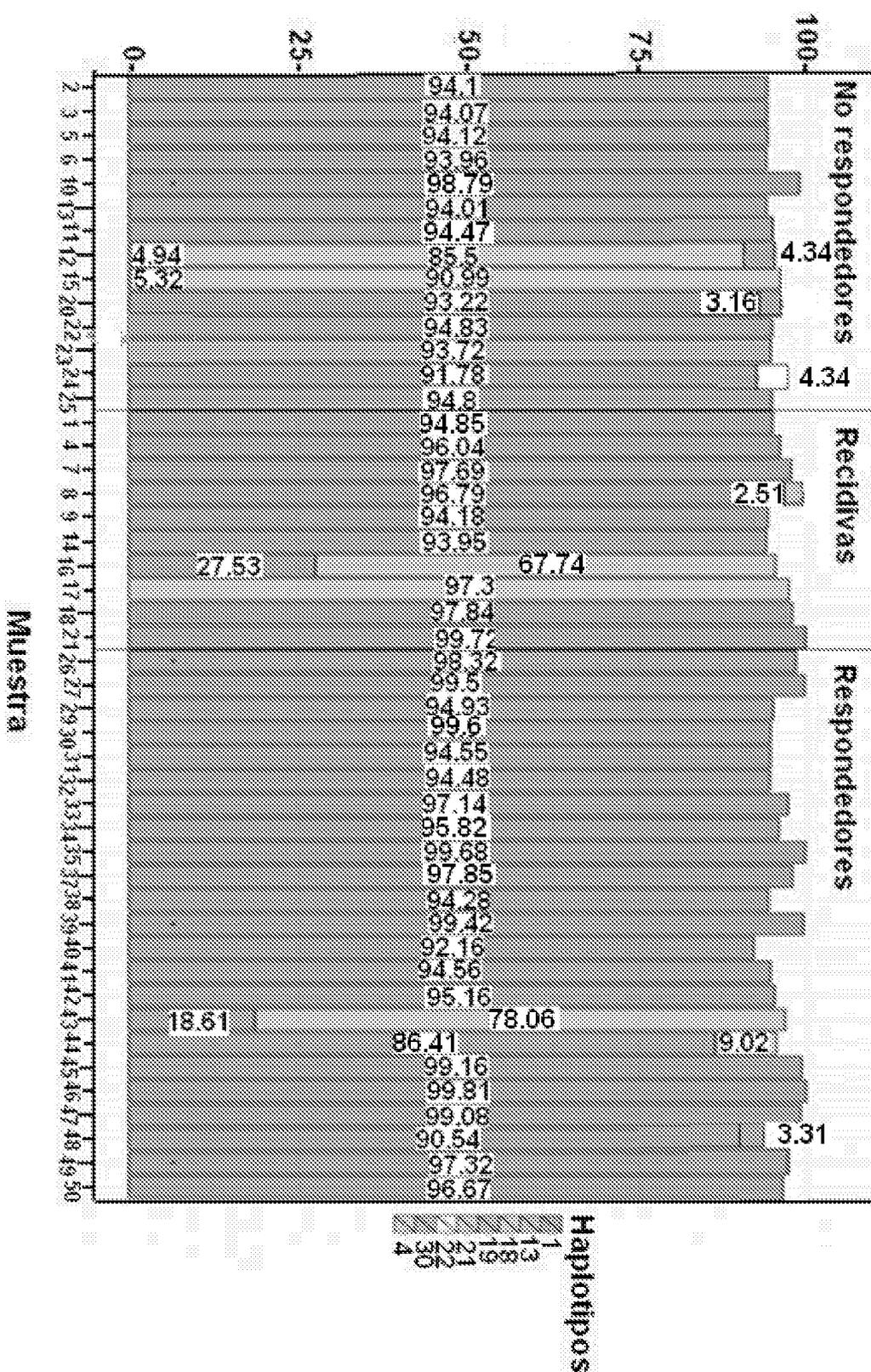
17.- Un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método según las reivindicaciones 3-9.

18.- Una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método según las reivindicaciones 3-9.

Fig. 1

#Epitopoinmunodominante	GYKVLVLNPS	VAATLGFGAY
#Haplotipo7P.....
#Haplotipo11P....
#Haplotipo15S.....

Fig.2



ES 2 546 153 B1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
<110> UNIVERSIDAD DE GRANADA
<110> CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA EN RED

<120> Polimorfismos para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral.

<130> FIBAO-13039
<130> P-06781

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda Virus Hepatitis C

<400> 1
caagtggcac atctacacgc gcccacagg
29

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda Virus Hepatitis C

<400> 2
tggcactcat cacatattat gatgtcatag gc
32

<210> 3
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sonda Virus Hepatitis C

<400> 3
gggaagagta ctaaggtgcc ggctgcgtat gc
32

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 546 153 B1

<220>

<223> Sonda Virus Hepatitis C

<400> 4

caaccaccgt cagctaggaa cttgccgtat gt

32