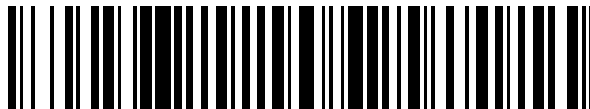


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 874**

21 Número de solicitud: 201230368

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.03.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.09.2013

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (67.0%)
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
C/ Einstein, 3
28049 Madrid ES y
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y
DIGESTIVAS (CIBEREHD) (33.0%)

72 Inventor/es:

LÓPEZ RODRÍGUEZ, Rosario;
MORENO OTERO, Ricardo y
SANZ CAMENO, Paloma

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Método in vitro de pronóstico de fibrosis hepática grave**

57 Resumen:

Método in vitro de pronóstico de fibrosis hepática grave.

La presente invención se refiere a un método in vitro de obtención de datos útiles para el pronóstico de fibrosis hepática grave en hepatitis C crónica caracterizado por la detección del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2 o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él. También se refiere a un método in vitro para el pronóstico y/o diagnóstico de dicha patología que se caracteriza por la detección de dichos polimorfismos y la determinación de variables clínicas o de otros polimorfismos. La presente invención se refiere también a uso del polimorfismo rs3778216 del gen HDAC2 o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él como marcador pronóstico de fibrosis hepática grave y también al uso de un kit que comprende sondas para su detección.

ES 2 422 874 A1

DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* de pronóstico de fibrosis hepática grave.

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* de pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave para enfermedades crónicas del hígado, preferentemente hepatitis crónica C, que se caracteriza por la detección del polimorfismo genético rs3778216 del gen *HDAC2* o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él ($r^2 \geq 0,8$). La inclusión de la determinación de una variable clínica, preferentemente la determinación de la concentración de la aspartato aminotransferasa (AST), en una muestra biológica aislada permite el diagnóstico de fibrosis hepática F>2 en pacientes con hepatitis crónica C. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la medicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La fibrosis hepática es una patología que se caracteriza por acumulación excesiva de matriz extracelular en el parénquima hepático que conlleva una alteración estructural y funcional de este órgano. La fibrosis hepática es común en enfermedades crónicas del hígado como son la hepatitis causada por el virus de la hepatitis C, la hepatitis causada por el virus de la hepatitis B, la enfermedad de hígado graso no alcohólica y la enfermedad hepática alcohólica (Poynard, T. y cols. *Adv Clin Chem* 2008, 46:131-160).

20 La infección por virus de la hepatitis C (VHC) es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica mundial, afectando aproximadamente a 170 millones de personas (Brown, R.S. *Nature* 2005, 436:973-978.). La actual terapia antiviral consiste en interferón alfa pegilado más ribavirina; sin embargo, se observa una alta variabilidad en la tasa de respuesta obtenida con este tratamiento. Esta variabilidad se asocia tanto a factores virales como factores del paciente.

25 Uno de los factores virales más importantes es el genotipo viral. Así la erradicación del virus de la hepatitis C es especialmente difícil en los pacientes infectados por genotipo viral 1, alcanzando una tasa de respuesta cercana al 50% de los pacientes tratados mientras que los pacientes con genotipos virales 2 y 3 responden un 70% aproximadamente.

30 Entre los factores del paciente que influyen en el resultado del tratamiento antiviral se incluyen el sexo, la edad o el índice de masa corporal. Además, se han descrito recientemente distintos polimorfismos en el gen IL-28B, que codifica para el interferón $\lambda 3$, que influyen muy significativamente en la respuesta al tratamiento, remarcando la importancia del perfil genético del paciente en la respuesta a estos fármacos (Suppiah, V. y cols. *Nat Genet* 2009, 41(10):1100-4. Tanaka, Y. y cols. *Nat Genet* 2009, 41(10):1105-9. Ge, D. y cols. *Nature* 2009, 461(7262):399-401).

35 El fracaso de la terapia tiene importantes repercusiones clínicas debido a que esta enfermedad evoluciona frecuentemente a fibrosis, pudiendo desencadenar en cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC), de costoso manejo y que constituyen la principal causa de trasplante hepático. De forma similar a la respuesta al tratamiento, la progresión y pronóstico de la hepatitis crónica C (HCC) es muy variable entre los distintos pacientes, indicando la relevancia de la variabilidad genética interindividual en la etiopatogenia de la HCC.

40 El diagnóstico de la fibrosis hepática tradicionalmente se realiza a partir de una biopsia hepática. La escala METAVIR, permite valorar el grado de fibrosis hepática clasificado en 5 estadios (Bedossa, P., Poynard, T. *Hepatology* 1996, 24(2):289-293): fibrosis ligera o ausente (hígado sin fibrosis o fibrosis portal sin septos lobares, F0 y F1), fibrosis moderada (fibrosis portal con pocos septos, F2), fibrosis grave (numerosos septos incompletos con distorsión de la arquitectura hepática, pero sin cirrosis, F3), y cirrosis (F4). Dependiendo del estadio, el pronóstico del paciente es mejor o peor, siendo el estadio de cirrosis (F4) el más grave. Sin embargo, esta técnica es invasiva, limitada por problemas de variabilidad debidos al tamaño de la biopsia, de interpretación subjetiva, difícil repetición periódica y de elevado coste económico. Por estos motivos, se necesitan test de diagnóstico no invasivos que puedan reemplazar la biopsia hepática basados en pruebas indirectas más seguras para el paciente y de menor coste socioeconómico.

45 Así se desarrollaron diversos índices como APRI o, más recientemente, FIB-4, que combinan diversos marcadores fibrogénicos en sangre periférica en una relación simple (Wai, C.T. y cols. *Hepatology* 2003, 38(2):518-26. Sterling, R.K. y cols. *Hepatology* 2006, 43(6):1317-25). Posteriormente, se instauraron otros índices para diagnosticar la progresión de la enfermedad en el hígado y su gravedad, que incluían la medición y el análisis en funciones matemáticas (regresión logística) de los niveles de dichos marcadores biológicos junto a otras variables clínicas para proporcionar una puntuación de fibrosis, como Fibrotest, ELF, Fibrometer, Fibrospect, y Hepascore (Imbert-Bismut, F. y cols. *Lancet* 2001, 357(9262):1069-75. Rosenberg, W.M. y cols. *Gastroenterology* 2004, 127(6):1704-13. Cales,

5 P. y cols. *Hepatology* 2005, 42(6):1373-81. Patel, K. y cols. *J Hepatol* 2004, 41(6):935-42. Adams, L.A. y cols. *Clin Chem* 2005, 51(10):1867-73.), entre otros (para una revisión de todos estos métodos ver Pinzani, M. *Hepatology* 2011, 54(4):1476-7). A pesar de la validez de estas escalas para diagnosticar la fibrosis hepática, recopilado en un metanálisis reciente, se sigue proponiendo la necesidad de la biopsia hepática para discriminar determinados estadios de fibrosis (Poynard, T. y cols. *Advances in Clinical Chemistry* 2008, 46:131-156).

10 Por otra parte, se han desarrollado otros sistemas no invasivos para el diagnóstico de la fibrosis hepática mediante métodos físicos, por ejemplo elastometría ecográfica, que evalúa la rigidez del hígado (LSE). Sin embargo, la tasa de errores de clasificación utilizando un único punto de corte de rigidez hepática impide su aplicación para detectar a los pacientes con ausencia de fibrosis o fibrosis mínima. Además, esta técnica no está disponible en todos los centros sanitarios debido a su coste, y al hecho de que en algunos países no se ha validado como método diagnóstico.

15 Recientemente, se ha propuesto que la combinación de diversos biomarcadores de fibrosis, marcadores clínicos y demográficos, junto a los resultados obtenidos de las pruebas de imagen (como el Fibroscan™ o ARFI) pueden abolir la necesidad de la biopsia para diagnosticar la presencia y/o gravedad de la patología hepática en la mayoría de los casos, más aún para determinados estadios de fibrosis (Cales, P. y Boursier, J. WO 2010/097472).

20 A pesar de los diversos métodos comentados para diagnosticar la gravedad de la fibrosis hepática en los pacientes con HCC, la disponibilidad de test capaces de evaluar la predisposición de un paciente para desarrollar fibrosis es todavía muy limitada. Aunque la hepatitis crónica C es una enfermedad de evolución lenta, que requiere décadas para progresar a fibrosis avanzada en la mayoría de los casos, existe un subgrupo de pacientes que presenta una tasa de progresión más rápida, según ha sido descrito en la literatura (Seeff, L.B. *Liver Int* 2009, 29:89-99. Marcellin, P. y cols. *Hepatology* 2002, 36: S47-56). La variabilidad en la tasa de evolución de esta enfermedad entre los distintos pacientes refleja la gran utilidad clínica de la identificación de marcadores genéticos de riesgo a la hora de establecer criterios terapéuticos que minimicen costes y efectos adversos. Además, los factores de riesgo identificados hasta la fecha sólo explican el 30% de los casos que progresan a fibrosis grave y cirrosis, lo que indica la importancia del perfil genético de los pacientes a la hora de desarrollar cirrosis y/o CHC con mayor o menor celeridad.

30 En este sentido, se han caracterizado diversos polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en genes implicados en la regulación de la respuesta inmune para el VHC (IFN, TNF, IL-10, LDL, MCP-2), asociados a la progresión de fibrosis en pacientes con HCC (Missiha, S.B. y cols. *Gastroenterology* 2008, 134(6):1699-714. Bataller, R. y cols. *Hepatology* 2003, 37(3):493-503. Powell, E.E. y cols. *Hepatology* 2000, 31(4):828-33. Romero-Gómez, M. y cols. *Liver Int.* 2011, 4:443-460). No obstante, estos estudios han suscitado una importante controversia debido a que muchos de ellos han sido realizados en cohortes pequeñas de pacientes y no han podido ser confirmados en series independientes. Recientemente, se ha descrito una región en el gen IFNGR2 (Nalpas, B. y cols. *Gut* 2010, 59:1120-1126), que incluye distintos polimorfismos (rs9976971, rs10600672, rs2284553 y rs17882748) asociados a estadios de fibrosis hepática 3 y 4 (frente a un grupo comparador de pacientes con estadios de fibrosis 0 y 1). No obstante, este método no analiza la influencia de otras variables clínicas de riesgo asociadas a fibrosis, ni establece un modelo predictivo. Asimismo, este estudio no tiene en cuenta a los pacientes que se encuentran en un estadio de fibrosis moderada (F=2), grupo mayoritario en esta patología.

45 Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento prolongado con interferón alfa pegilado (de elevado coste económico y con importantes efectos adversos) disminuye significativamente la progresión de la cirrosis a CHC, por lo que la caracterización de polimorfismos genéticos relacionados con la progresión de esta enfermedad adquiere suma relevancia clínica y farmacoeconómica.

50 De forma interesante, Huang y cols. (*Hepatology* 2007, 46:297-306, US2010/0216154A1 y US2011/0129831A1) describieron una escala de riesgo de cirrosis (CRS) para pacientes con infección crónica por el VHC basado en un algoritmo procedente de la evaluación de siete SNPs en diversos genes candidatos (AZIN 1 (en el cromosoma 8), TLR4 (en el cromosoma 9), TRPM5 (en el cromosoma 11), AQP2 (en el cromosoma 12), y otros tres polimorfismos (en los cromosomas 1, 3 y 15)), mostrando la combinación de estos 7 marcadores un AUCROC (AUC-Area Under Curve o área bajo la curva; ROC-Receiver Operating Characteristic o característica operativa del receptor) de 0,73, que se incrementaba hasta 0,76 si se incluían otras variables clínicas. Aunque dicho método ha sido validado posteriormente por otros autores como predictor de progresión de la HCC a fibrosis y cirrosis, tanto desde estadios leves (Trepo, E. y cols. *J Hepatol* 2011, 55(1):38-44) como desde estadios moderados y graves (Marcolongo, M. y cols. *Hepatology* 2009, 50(4):1038-44. Curto, T.M. y cols. *Pharmacogenet Genomics* 2011, 21(12):851-60) en el estudio de Marcolongo y col, se validaron estos resultados solo en varones con un AUCROC de 0,73 mientras que en el estudio de Curto y cols. no observaron que la puntuación CRS fuera predictiva de la evolución clínica.

Por tanto, debido a la notable evolución de la enfermedad crónica del hígado por infección del virus de la hepatitis C a fibrosis hepática y cirrosis, principal causa de fallo y trasplante hepático, se hace necesario el desarrollo de métodos alternativos de pronóstico/diagnóstico no invasivos de evolución de los pacientes afectados a estadios de fibrosis grave, los cuales serían una herramienta de gran relevancia clínica.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe un método sencillo y preciso de pronóstico y diagnóstico de progresión de hepatopatías, preferentemente hepatitis C crónica, a estadios de fibrosis, preferentemente a estadios graves de fibrosis ($F>2$) que requiere uno o un bajo número de marcadores genéticos y que pueden incluir al menos una variable clínica, y que presenta alto nivel predictivo (AUCROCs), sensibilidad y especificidad.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave ($F>2$) caracterizado por la detección del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2 o cualquiera de los que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con él ($r^2 \geq 0,8$), en la muestra biológica aislada de un sujeto que padece una hepatopatía crónica. Preferiblemente la hepatopatía es hepatitis C. La invención se refiere también a métodos para el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en sujetos con una hepatopatía crónica, preferentemente hepatitis C crónica, que comprenden la detección de dichos polimorfismos, y la asociación de un genotipo concreto de al menos uno de dichos polimorfismos con el riesgo de padecer fibrosis hepática grave. Estos métodos pueden incluir además la determinación de otras variables como la concentración de aspartato aminotransferasa (AST).

En la presente invención se muestran datos de asociación independiente y significativa del genotipo G/G del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2 con la probabilidad de desarrollar fibrosis hepática grave en pacientes infectados con virus de la hepatitis C. Además, los métodos de la invención son capaces de predecir la evolución a fibrosis hepática grave de un paciente con hepatopatía crónica. La presente invención muestra la utilidad de la determinación del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2 como marcador para el pronóstico de fibrosis hepática grave. Además, se muestran resultados de la utilidad de los métodos de la invención en la predicción del pronóstico de fibrosis hepática grave. El polimorfismo rs3778216 del gen HDAC2, se asocia de manera independiente y significativa con la probabilidad de desarrollar fibrosis, y más concretamente fibrosis grave ($F>2$), en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C (regresión logística, $p=0,028$).

El polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2, número de referencia de la Sociedad de Variaciones Genómicas Humanas ("*Human Genome Variation Society*", HGVS) NM_001527.3:c.165+507G>A o NC_000006.11:g.114280563C>T, o también denominado rs3778216, se refiere a un SNP situado en la posición 114280563 del cromosoma 6 de *homo sapiens* (número de acceso al *GenBank* del NCBI de la secuencia del cromosoma 6 de *homo sapiens*: NT_025741.15). El polimorfismo rs3778216 se sitúa en un intrón del gen HDAC2. Los genotipos puede ser homocigoto de adeninas (A/A), heterocigoto adenina/guanina (A/G) u homocigoto de guanina (G/G).

En la presente invención la presencia de al menos un alelo A en el polimorfismo rs3778216 es protector, mientras que portar el genotipo G/G incrementa el riesgo de fibrosis hepática grave. El gen HDAC2 se refiere a la secuencia de polinucleótidos que codifica para la proteína denominada histona deacetilasa 2 o "*histone deacetylase 2*" (HDAC2) (con número de acceso al *NCBI Reference Sequence*: NC_000006.11 y NM_001527.3).

Dado que el polimorfismo rs3778216 presenta utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la fibrosis hepática grave, cualquier otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él (es decir se hereda e conjunto con él), presentaría la misma capacidad. El polimorfismo rs3778216 del gen HDAC2 (NT_025741.15) se encuentra en desequilibrio de ligamiento por ejemplo con los polimorfismos rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 con un valor de $r^2 \geq 0,8$ en la población Caucásica. Por lo tanto, cualquiera de estos SNPs puede estar asociado a fibrosis hepática grave, ya que se heredan en bloque junto con el polimorfismo rs3778216 (Tabla 1). Los genotipos asociados al incremento del riesgo de cada uno de estos polimorfismos en desequilibrio de ligamiento con el genotipo G/G del SNP rs3778216 son: genotipo A/A del polimorfismo genético rs13212298; genotipo C/C del polimorfismo genético rs12665655; genotipo A/A del polimorfismo genético rs13204445; genotipo T/T del polimorfismo genético rs13204434; genotipo A/A del polimorfismo genético rs13194921; genotipo T/T del polimorfismo genético rs13209064; genotipo C/C del polimorfismo genético rs13213007; genotipo T/T del polimorfismo genético rs13216873; genotipo G/G del polimorfismo genético rs12660414; genotipo T/T del polimorfismo genético rs2025191; genotipo A/A del polimorfismo genético rs13201727; genotipo C/C del polimorfismo genético rs1322453.

Por todos estos motivos, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave caracterizado por la detección de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende: rs3778216, rs13209064,

rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 en la muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis crónica C. En adelante nos referiremos a este método como el método primero de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención el polimorfismo del gen HDAC2 es el polimorfismo rs3778216.

5

El término “*in vitro*” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

El término “pronóstico” en la presente invención se refiere a la capacidad de detectar pacientes o sujetos asintomáticos que presentan una alta probabilidad de desarrollar fibrosis hepática grave, aún cuando en el momento del diagnóstico no presenten dicha patología. El término “pronóstico” también se refiere a la capacidad de detectar sujetos previamente diagnosticados de fibrosis en estadios de fibrosis ligera o moderada con alta probabilidad de sufrir un empeoramiento de la enfermedad, es decir, de desarrollar fibrosis grave.

10

Se entiende por “diagnóstico” en la presente invención, la determinación del estadio de la fibrosis hepática en un momento concreto de su desarrollo. En la presente invención, “diagnóstico” se refiere a la determinación de un estadio de fibrosis hepática grave (F>2).

15

Un modelo se considera predictivo cuando la AUCROC es mayor de 0,5. El AUCROC se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos caso y control, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicarles el modelo matemático (combinación de variables asociadas independientemente a fibrosis). El AUCROC por convenio está comprendido entre 0,5 y 1: cuanto más cercano a 1 es el valor AUCROC de una variable, más preciso y predictivo se considera. La sensibilidad de la prueba diagnóstica es la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad. Mide su capacidad para detectar la característica estudiada cuando está presente. La especificidad de una prueba indica la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad, en este caso F>2 (Burgueño MJ et al. *Med Clin (Barc)* 1995, 104:661-670).

20

25

En la presente invención se entiende por “fibrosis hepática” el acúmulo intrahepático de tejido conectivo fibroso que se origina a consecuencia de un proceso reparativo, reactivo o inflamatorio crónico del hígado, que conlleva la alteración estructural y funcional del parénquima hepático.

30

Se entiende por “fibrosis hepática grave” aquella acumulación de fibras de matriz extracelular, por ejemplo colágeno, que sucede en las enfermedades hepáticas crónicas. Esta definición, en la presente invención incluye los estadios F>2 (que incluye tanto F=3 como F=4) según la escala METAVIR. La fibrosis hepática se clasifica siguiendo la escala METAVIR, según la cual existen 5 estadios (Bedossa, P. y Poynard, T. *Hepatology* 1996, 24(2):289-293): F0 o fibrosis ausente, donde el hígado no presenta fibrosis; F1 o fibrosis ligera, se refiere a la fibrosis portal sin septos lobares; F2 o fibrosis moderada, se refiere a la fibrosis portal con pocos septos; F3 o fibrosis grave, donde existen numerosos septos incompletos con distorsión de la arquitectura hepática pero sin cirrosis; y F4 fibrosis muy grave o cirrosis. Dependiendo del estadio el pronóstico del paciente es mejor o peor, siendo el estadio de cirrosis (F4) el más grave. La fibrosis puede resultar en cirrosis, fallo hepático, hipertensión portal y frecuentemente el paciente requiere un trasplante hepático.

35

40

Se entiende por “hepatopatología”, “hepatopatía” o “patología hepática” en la presente invención, como aquella enfermedad del hígado que puede deberse a distintas etiologías, entre ellas puede ser causada por hepatitis crónica C, que conlleva la disfunción de dicho órgano.

45

En la presente invención “hepatitis crónica C” se refiere a la enfermedad hepática causada por infección del virus de la hepatitis C que produce de forma general una inflamación crónica del hígado, que puede resultar en fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepático (Yano, M. y cols. *Hepatology* 1996, 23:1334-1340. Brown, R.S. *Nature* 2005, 436:973–978).

50

El término “polimorfismo genético” se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de la cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) que tiene al menos una frecuencia del 1% en los individuos de una población. Los polimorfismos genéticos pueden ser variaciones de uno o varios nucleótidos. Los polimorfismos de un solo nucleótido, “*single nucleotide polymorphism*” o SNP, generalmente dan lugar a dos alelos. Los SNPs o polimorfismos pueden contener información sobre la variación de un solo polimorfismo o la información de un haplotipo si son SNP etiquetas o “tagSNP”.

55

Haplotipo es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci.

60

En la presente invención nos referimos a “haplotipo” como un conjunto de polimorfismos (SNPs) que se heredan en bloque con unas medidas de desequilibrio de ligamiento $r^2 \geq 0,8$ y que se identifican mediante el genotipado de uno de los polimorfismos incluidos en dicho haplotipo.

5 “Desequilibrio del ligamiento” (LD del inglés “*linkage disequilibrium*”) es la propiedad de algunos genes de no segregar de forma independiente, es decir, poseen una frecuencia de recombinación menor del 50%. Esto suele deberse a que los dos loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria con la separación de los cromosomas en anafase (Reich, D.E. y cols. *Nature* 2001, 411(6834):199-204).

10 “ r^2 ” es una medida del desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores genéticos. Dos SNPs que no han sido separados por recombinación (LD total) muestran un $r^2=1$. En tal caso la genotipación de ambos SNPs sería redundante (Pritchard, J.K. y Przeworski, M. *Am J Hum Genet* 2001, 69(1):1-14). Por lo tanto, mediante los datos proporcionados por el Hapmap con un $r^2 > 0,8$ seríamos capaces de ver prácticamente todos los SNPs de un haplotipo mediante el genotipado de su tagSNP (de Bakker, P.I. y cols. *Nature Genetics* 2005, 37(11):1217-23).

15 Los términos “polinucleótido”, “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

20 Los términos “secuencia de aminoácidos” o “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados. El término “residuo” corresponde a un aminoácido.

25 La detección del polimorfismo se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia para tal fin. Por ejemplo se puede realizar mediante kits de genotipado, secuenciación o mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y posterior análisis con enzimas de restricción o mediante PCR a tiempo real. Los kits de genotipado pueden contener oligonucleótidos marcados con fluoróforos y puede requerir la hibridación de estos con una muestra biológica aislada de un sujeto.

30 El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación de los nucleótidos de un ácido nucleico molde y de su orden.

35 El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ácido nucleico molde, donde ésta puede ser realizada utilizando sondas fluorescentes. En una realización preferida, la amplificación tiene lugar mediante PCR a tiempo real.

40 El término “ácido nucleico molde” o “molde”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena que va a ser amplificada o secuenciada.

El aumento del número de copias de un ácido nucleico molde se realiza por síntesis de ADN complementario mediante unas condiciones que lo permitan.

45 Las condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario se refiere a las condiciones en las que puede tener lugar la incorporación de los nucleótidos a un ADN naciente mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde.

50 Las condiciones en las cuáles se realiza la secuenciación o la amplificación generalmente incluyen (a) poner en contacto un ácido nucleico molde con una polimerasa en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente, (por ejemplo, Mg^{2+}), y nucleótidos, generalmente, dNTPs y, al menos, un ddNTP, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que la polimerasa inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario, generalmente, mediante electroforesis, permite determinar la secuencia de nucleótidos.

55 El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa.

60 Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

El término “cebador específico”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de nucleótidos en el ácido nucleico molde que se quiere amplificar o secuenciar.

5 El término “cebador arbitrario” se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere amplificar o secuenciar. Con frecuencia se emplea una población de distintos cebadores arbitrarios. El término “cebadores arbitrarios” se refiere a un conjunto de cebadores cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere amplificar o secuenciar.

10 El término “hibridación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al apareamiento de dos moléculas de ADN de cadena simple complementarias para dar una molécula de doble cadena. Preferiblemente, la complementariedad es del 100%. Esto es, en la región de complementariedad cada nucleótido de una de las dos moléculas de ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en la otra molécula de ácido nucleico. Sin embargo, aquéllos con una experiencia normal en el campo reconocerán que dos moléculas de ácido nucleico que posean una región con complementariedad menor al 100% también pueden hibridar.

15 El término “nucleótido”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a un molécula orgánica formada por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. El término nucleótido incluye desoxirribonucleósidos trifosfato como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos. El término nucleótido incluye también dideoxirribonucleósidos trifosfato (ddNTPs), como por ejemplo, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP, ddTTP o derivados de los mismos.

20 De acuerdo con la presente invención un “nucleótido” o un “cebador” puede ser marcado o etiquetado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

25 El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita obtener ADN del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, e incluye, pero sin limitarnos, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, un tejido o una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, mucosa oral, lavado broncoalveolar, linfa o fluido ascítico. Dentro de las muestras biológicas una de las que presenta mayor utilidad es la mucosa oral ya que es de fácil obtención y no supone alteración alguna para el individuo. Por ello, preferentemente la muestra es sangre y/o mucosa oral, más preferentemente, sangre periférica y/o mucosa oral. Asimismo, la muestra biológica puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

30 Se entiende por “sujeto” aquel individuo susceptible de padecer fibrosis hepática grave. Preferentemente el sujeto es un humano.

35 Por otra parte, los resultados revelan que la inclusión del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2 junto a la determinación de la concentración de la enzima AST (niveles séricos previos al tratamiento o última determinación disponible en el caso de individuos no tratados) en la muestra biológica aislada de un sujeto es un método diagnóstico de fibrosis hepática grave con una AUCROC altamente predictiva. Por tanto una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el pronóstico de fibrosis hepática grave caracterizado por la detección de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298, preferiblemente el polimorfismo rs3778216, en la muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis crónica C, donde además se detectan los niveles de aspartato aminotransferasa (AST).

40 En la presente invención se ha observado que el valor predictivo del método de pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave caracterizado por la detección del polimorfismo rs3778216 del gen HDAC2 o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él, solo o en combinación con AST, es mayor cuando se detectan también los polimorfismos genéticos rs2030171 del gen STAT1 y/o el polimorfismo rs12436555 del gen ISGF3G, o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con ellos.

45 El polimorfismo rs2030171 del gen STAT1 se refiere al número de referencia de la Sociedad de Variaciones Genómicas Humanas (“*Human Genome Variation Society*”, HGVS) NC_000002.11:g.191869163G>A, NG_008294.1:g.14814C>T, NM_007315.3:c.372+3126C>T, NM_139266.2:c.372+3126C>T o también denominado rs2030171 se refiere a un SNP situado en la posición 191869163 del cromosoma 2 de homo sapiens (número de acceso al *GenBank* de la secuencia del cromosoma 2 de *homo sapiens*:NT_005403.17). La asociación con un peor pronóstico, es decir, el desarrollar fibrosis hepática grave, se obtiene cuando el sujeto es portador del alelo A del polimorfismo genético A/G del rs12436555 del gen ISGF3G y/o es portador del genotipo G/G del polimorfismo

genético A/G rs2030171 del gen STAT1. La detección de estos polimorfismos se puede realizar al igual que la del polimorfismo rs3778216 o mediante otras técnicas conocidas por el experto en la materia para tal fin. El polimorfismo rs2030171 se sitúa en un intrón del gen STAT1. Los genotipos pueden ser homocigoto de adeninas (A/A), heterocigoto adenina/guanina A/G o homocigoto de guanina (G/G). En la presente invención la presencia de al menos un alelo A en el polimorfismo rs2030171 es protector mientras que portar el genotipo G/G incrementa el riesgo de fibrosis hepática grave.

El polimorfismo rs2030171 del gen STAT1 (NT_025741.15) se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos rs13029247, rs10173099, rs10199181 y rs6745710 del mismo gen con un valor de $r^2 \geq 0,8$ en población Caucásica. Por lo tanto, cualquiera de estos SNPs puede estar asociado a fibrosis hepática grave ($F > 2$) ya que se heredan en bloque junto con el rs2030171 (Tabla 1). Los genotipos asociados al incremento del riesgo de cada uno de estos polimorfismos en desequilibrio de ligamiento con el genotipo G/G del SNP rs2030171 son: genotipo T/T del polimorfismo genético rs13029247; genotipo C/C del polimorfismo genético rs10173099; genotipo T/T del polimorfismo genético rs10199181 y genotipo C/C del polimorfismo genético rs6745710.

El polimorfismo rs12436555 del gen ISGF3G se refiere a número de referencia de la Sociedad de Variaciones Genómicas Humanas ("Human Genome Variation Society", HGVS) NC_000014.8:g.24634825G>A, NM_006084.4:c.992-231G>A o también denominado rs12436555 se refiere a un SNP situado en la posición 24634825 del cromosoma 14 de *homo sapiens* (número de acceso al *GenBank* de la secuencia del cromosoma 14 de *homo sapiens*: NT_026437.12). El polimorfismo rs12436555 se sitúa en un intrón del gen ISGF3-GAMMA (también conocida la proteína como p48 o "*interferon regulatory factor 9*"). Los genotipos pueden ser homocigoto de adeninas (A/A), heterocigoto adenina/guanina A/G o homocigoto de guanina (G/G). En la presente invención la presencia de al menos un alelo A en el polimorfismo rs12436555 incrementa el riesgo de fibrosis hepática grave mientras que portar el genotipo G/G es protector.

El polimorfismo rs12436555 del gen ISGF3G (NT_026437.12) se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos rs10583 y 12432194 (gen TM9SF1 e ISGF3G, respectivamente) con un valor de $r^2 \geq 0,8$ para ambos en población Caucásica. Por lo tanto, puede estar asociado a fibrosis hepática grave ya que se heredan en bloque junto con el rs12436555 (Tabla 1). Los genotipos asociados al incremento del riesgo de cada uno de estos polimorfismos en desequilibrio de ligamiento con el alelo A del polimorfismo rs12436555 son: portador de al menos un alelo de T del polimorfismo genético rs12432194 del gen ISGF3G; portador de al menos un alelo de A del polimorfismo genético rs10583 del gen TM9SF1.

Por todo lo aquí descrito, otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el pronóstico de fibrosis hepática grave caracterizado por la detección de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298, preferiblemente el polimorfismo rs3778216, en la muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis crónica C, donde además se detectan los niveles de AST, al menos un polimorfismo genético del gen STAT1 seleccionado de la lista que comprende rs2030171, rs13029247, rs10173099, rs10199181, y rs6745710, y/o al menos un polimorfismo genético del gen ISGF3G o del gen TM9SF1 seleccionado de la lista que comprende: rs12436555, rs12432194 y rs10583. En una realización más preferida, el polimorfismo del gen STAT1 es rs2030171. En otra realización más preferida, el polimorfismo genético del gen ISGF3G es rs12436555.

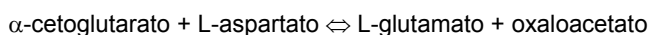
Por otro lado, teniendo en cuenta todo lo previamente descrito, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en un sujeto que padece hepatitis C crónica caracterizado por:

a. La detección al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende: rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 en la muestra biológica aislada de un sujeto,

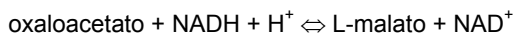
b. la asociación del genotipo G/G del polimorfismo genético rs3778216, del genotipo A/A del polimorfismo genético rs13212298, del genotipo C/C del polimorfismo genético rs12665655, del genotipo A/A del polimorfismo genético rs13204445, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs13204434, del genotipo A/A del polimorfismo genético rs13194921, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs13209064, del genotipo C/C del polimorfismo genético rs13213007, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs13216873, del genotipo G/G del polimorfismo genético rs12660414, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs2025191, del genotipo A/A del polimorfismo genético rs13201727, y/o del genotipo C/C del polimorfismo genético rs1322453 del gen HDAC2 a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el polimorfismo del paso (a) es rs3778216 y el genotipo que se asocia a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en el paso (b) es el genotipo G/G del polimorfismo genético rs3778216.

5 La aspartato aminotransferasa (AST), también llamada transaminasa glutámico oxalacética (GOT), es una enzima presente en el hígado así como en otros órganos como corazón y músculo esquelético (Número de acceso al NCBI: NP_002070.1). En la presente invención se demuestra que el método segundo de la invención es aun más predictivo cuando incluye la determinación de la concentración de la AST que cuando sólo incluye la detección del polimorfismo rs3778216 del gen HDAC2 o cualquiera de los polimorfismos en desequilibrio de ligamiento con este.
10 Asimismo, la AUCROC de la variable AST, uno de los marcadores de riesgo más utilizados en las diversas escalas de fibrosis hepática grave, es más precisa si se incluye en el modelo la determinación del rs3778216 del gen HDAC2. La detección de la AST se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia para tal fin, como por ejemplo mediante métodos validados (Bergmeyer, H.U. y cols. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986, 24:497-510) o mediante análisis de sangre *in vitro* utilizando el kit Cobas® (Roche) acorde con la federación internacional de química clínica (IFCC). Brevemente, la técnica consiste en añadir a la muestra un tampón TRIS pH7,8, una enzima indicadora (malato deshidrogenasa o MDH), una coenzima (LDH) y alfa-cetoglutarato. La enzima AST cataliza esta reacción de equilibrio:



20 El incremento de oxaloacetato se determina en la reacción indicadora que es catalizada por la malato-deshidrogenasa:



25 NADH se oxida a NAD⁺. La tasa de disminución de NADH se mide fotométricamente y es directamente proporcional a la tasa de formación de oxaloacetato y con ello, a la actividad de AST. Niveles de AST superiores a 40 U/l se asocian a una peor evolución de la fibrosis.

30 Por todo ello, una realización preferida del segundo método de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de fibrosis hepática grave donde en el paso (a) además se detectan los niveles de AST en la muestra biológica aislada, y la asociación a un diagnóstico del paso (b) se obtiene si los valores de AST son superiores a 40 U/l.

35 Cualquiera de los métodos descritos en la presente invención, pueden comprender, además de la determinación de la AST, y los polimorfismos, la determinación de otras variables clínicas, como por ejemplo, aunque sin limitarse, edad, sexo, determinación de otras transaminasas como por ejemplo la alanina aminotransferasa (ALT, o también denominada transaminasa glutámico pirúvica, GPT), recuento plaquetario, nivel de albumina, o la carga viral (preferentemente carga viral del virus de la hepatitis C) en el caso de hepatopatías causadas por virus. Preferentemente la otra variable clínica utilizada es la edad, en cuyo caso, una edad del sujeto superior a 40 años se asociaría con un peor diagnóstico y pronóstico del paciente.

40 Por ello, otra realización preferida del segundo método de la invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave donde en el paso (a) además se analiza la edad del paciente, y la asociación a un pronóstico y/o diagnóstico de F>2 del paso (b) se obtiene si la edad del paciente es superior a 40 años.

45 Por otro lado, debido a lo descrito previamente, una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere a un método donde en el paso (a) además se detecta al menos un polimorfismo genético del gen STAT1 seleccionado de la lista que comprende: rs2030171, rs13029247, rs10173099, rs10199181 y rs6745710, y/o al menos un polimorfismo genético del gen ISGF3G o del gen TM9SF1 seleccionado de la lista que comprende: rs12436555, rs12432194 y rs10583. En una realización más preferida, el polimorfismo del gen STAT1 es rs2030171. En otra realización más preferida, el polimorfismo genético del gen ISGF3G es rs12436555.

50 Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en el paso (b) se obtiene cuando además el sujeto es portador del genotipo G/G del polimorfismo genético rs2030171, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs13029247, del genotipo C/C del polimorfismo genético rs10173099, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs10199181, o del genotipo C/C del polimorfismo genético rs6745710 del gen STAT1, y/o el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en el paso (b) se obtiene cuando además el sujeto es portador del alelo A del polimorfismo genético rs12436555 o del alelo T del polimorfismo genético rs12432194 del gen ISGF3G, o del alelo A del polimorfismo genético rs10583 del gen TM9SF1. En una realización más preferida, el genotipo del gen STAT1 que se asocia a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en el paso (b) es el genotipo G/G del polimorfismo genético rs2030171. En otra realización más preferida, el genotipo del gen ISGF3G que se asocia a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en el paso (b) es el alelo A del polimorfismo genético rs12436555.

Una realización preferida del primer y del segundo aspectos de la invención se refiere al método donde la muestra biológica se selecciona de la lista que comprende tejido, sangre, plasma, suero, mucosa oral, linfa y/o cualquier otra muestra biológica que permita extraer ADN. Preferentemente la muestra biológica es sangre o mucosa oral, más preferentemente la sangre es sangre periférica. Otra realización preferida se refiere al método donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

Otra realización preferida del primer y del segundo aspectos de la invención se refiere al método donde la detección del polimorfismo se realiza mediante hibridación con sondas marcadas, preferiblemente con fluorescencia.

Otra realización preferida del primer y del segundo aspectos de la invención se refiere al método donde el sujeto es un humano.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende: rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 como marcador pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en un sujeto que padece hepatitis C crónica. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polimorfismo genético es el polimorfismo rs3778216.

En la presente invención, se entiende por “marcador pronóstico”, aquel polimorfismo que sirve para determinar la evolución o no de la fibrosis hepática a fibrosis hepática grave.

Otra realización preferida se refiere al uso *in vitro* de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende: rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 como marcador pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en un sujeto que padece hepatitis C crónica donde además se usa en combinación con la concentración de la AST.

Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende: rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 como marcador pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en un sujeto que padece hepatitis C crónica donde además se usa en combinación con la concentración de la AST, la edad, al menos un polimorfismo genético del gen STAT1 seleccionado de la lista que comprende: rs2030171, rs13029247, rs10173099, rs10199181, y rs6745710, y/o al menos un polimorfismo genético del gen ISGF3G o del gen TM9SF1 seleccionado de la lista que comprende: rs12436555, rs12432194 y rs10583. En una realización más preferida el polimorfismo del gen STAT1 es el polimorfismo 2030171. En otra realización más preferida el polimorfismo del gen ISGF3G es rs12436555.

En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el sujeto es un humano.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende sondas que detectan al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende: rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 para la obtención de datos útiles para el pronóstico de fibrosis hepática grave en un sujeto que padece hepatitis C crónica. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polimorfismo es el polimorfismo rs3778216. En una realización más preferida de este aspecto de la invención las sondas que detectan el polimorfismo genético rs3778216 son SEQ ID NO:4 (O1 del SNP rs3778216-tabla 2), SEQ ID NO:5 (O2 del SNP rs3778216-tabla 2) y/o SEQ ID NO:6 (O3 del SNP rs3778216-tabla 2).

En la presente invención el término “sondas” se refiere a oligonucleótidos de un tamaño de entre 20 a 50 nucleótidos que hibridan con la secuencia de ADN que flanquea y/o contiene el polimorfismo de interés. Estas sondas, suelen estar marcadas con algún fluoróforo que permita identificar el polimorfismo.

La secuencia detectada en los ejemplos de la presente invención para la detección del polimorfismo genético rs3778216 es (SEQ ID NO:1), donde [T/C] es el polimorfismo rs3778216 reconocido por sondas que hibridan por complementariedad de bases (A/G). En concreto para este trabajo se han utilizado sondas del GoldenGate Genotyping Assay (Illumina) en el que se utilizan para la detección de un polimorfismo de interés tres oligonucleótidos, dos de ellos (O1 y O2) son específicos para cada uno de los posibles alelos del SNP (en este caso paso A ó G) e hibridan en sentido 5' y el tercer oligonucleótido (O3) sirve como control de especificidad de locus e hibrida varias bases *downstream* del polimorfismo (sentido 3'). Tras la hibridación se realiza una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que permite elongar la secuencia deseada utilizando cebadores marcados con los fluoróforos Cy3 y Cy5. El producto de PCR se somete a una posterior hibridación en una matriz con soporte (placa) o *array* que permite la determinación del genotipo del sujeto (Tabla 2).

Las sondas indicadas previamente son las utilizadas en los ejemplos, pero existen otros métodos conocidos por un experto en la materia para detectar polimorfismos. Así, por ejemplo aunque sin limitarse otra alternativa es utilizar cebadores y sondas fluorescentes de hibridación en un termociclador a tiempo real (por ejemplo LightCycler® de Roche). Estas sondas son oligonucleótidos que hibridan en la muestra de DNA, una marcada en su extremo 3' terminal (fluoróforo donador) y la otra marcada en su extremo 5' (fluoróforo aceptor) con el extremo 3'-hidroxilo bloqueado con un fosfato para evitar su extensión. Las sondas se localizan en la misma cadena sin solapar con los cebadores, cubriendo la secuencia en la que se encuentra la mutación. La detección de la mutación se produce por el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), que se produce por la excitación de la fluoresceína cuya longitud de onda de emisión solapa con la de excitación del fluoróforo aceptor. Las curvas de disociación se basan en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados que han hibridado con las sondas. El híbrido formado entre sonda y ADN de tipo silvestre tendrá una estabilidad mayor que el formado entre la sonda y el ADN mutado, puesto que en este caso la complementariedad no es absoluta. La mayor estabilidad de la unión entre la sonda y el ADN silvestre se reflejará en una temperatura de disociación o *melting* (T_m) superior. Las diferencias en la temperatura de disociación de los híbridos nos permitirá discriminar perfectamente entre el ADN de tipo silvestre y el de tipo mutado.

También se pueden utilizar sondas que utilizan la tecnología Taqman. Este ensayo utiliza la actividad 5' nucleasa de la polimerasa junto con dos sondas (TaqMan) para discriminar entre los dos alelos de un SNP. Cada una de las sondas TaqMan son complementarias a los dos alelos de un SNP y cada una tiene un "quencher" en su extremo 3' y una molécula fluorescente en el extremo 5'. Durante la fase de anillamiento-extensión de la PCR, la sonda se hibrida a los amplicones y la DNA polimerasa la rompe, lo que resulta en un incremento de la fluorescencia debido a que el "quencher" ya no se encuentra en las proximidades. La fluorescencia se detecta utilizando el RealTime ABI PRISM® 7900 Sequence Detector.

Hay multitud de sistemas que permiten identificar SNPs mediante la utilización de sondas de hibridación acopladas a un fluoróforo que mediante una PCR a tiempo real permiten identificar los alelos de un SNP en la muestra de un paciente, como por ejemplo, aunque sin limitarse, LightSNP, Taqman, SnapShot o MLPA.

Una realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende los elementos necesarios para determinar la concentración de AST.

En la presente descripción se entiende por "elementos necesarios" para determinar la concentración de AST todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención descritos anteriormente en este documento (tampones, enzimas, coenzimas y sustratos). Por otro lado los kits pueden incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización (tubos de plásticos, placas, reactivos, etc.). Los kits pueden contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, los kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Una realización aún más preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que además comprende sondas que detectan al menos un polimorfismo genético del gen STAT1 seleccionado de la lista que comprende: rs2030171, rs13029247, rs10173099, rs10199181, y rs6745710, y/o al menos un polimorfismo genético del gen ISGF3G o del gen TM9SF1 seleccionado de la lista que comprende: rs12436555, rs12432194 y rs10583. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención el polimorfismo genético del gen STAT1 es rs2030171 y/o el polimorfismo genético del gen ISGF3G es rs12436555. En una realización particular de este aspecto de la invención, las sondas que detectan el polimorfismo rs2030171 son SEQ ID NO:7 (O1 del SNP rs2030171-tabla 2), SEQ ID NO:8 (O2 del SNP rs2030171-tabla 2) y/o SEQ ID NO:9 (O3 del SNP rs2030171-tabla 2), y las sondas que detectan el polimorfismo rs12436555 son SEQ ID NO:10 (O1 del SNP rs12436555-tabla 2), SEQ ID NO:11 (O2 del SNP rs12436555-tabla 2) y/o SEQ ID NO:12 (O3 del SNP rs12436555-tabla 2).

Las sondas y oligonucleótidos empleados (SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9) se recogen en la tabla 2, y nos permitieron determinar en la secuencia (SEQ ID NO:2) el polimorfismo SNP rs2030171 [A/G] del gen STAT1.

Las sondas y oligonucleótidos empleados (SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12) se recogen en la tabla 2, y nos permitieron determinar en la secuencia SEQ ID NO:3 y el polimorfismo [A/G] rs12436555 del gen ISGF3G.

En general, el kit de la invención comprende todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención como se ha descrito anteriormente. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, enzimas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, dNTPs, una sal magnésica, sondas, fluorocromos, agentes para prevenir la contaminación, etc. El kit puede contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos; así como otra/s pareja/s de cebadores para la amplificación de una o varias secuencias nucleotídicas control. 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 el método de la invención.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el sujeto es un humano.

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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. El polimorfismo rs3778216 de la HDAC2 se asocia con el estadio de fibrosis. Se muestran los resultados de 176 pacientes de hepatitis crónica C con fibrosis leve o moderada ($F \leq 2$, $n=132$) o fibrosis grave ($F > 2$, $n=44$). A, portadores de al menos un alelo A (adenosina, $n=85$); G/G, portadores de los dos alelos G (guanina, $n=91$).

FIG. 2. AUROC de métodos pronóstico de fibrosis hepática. El área bajo la curva (AUC del inglés "area under the curve") por convenio está comprendido entre 0,5 y 1. La línea de referencia representa el valor mínimo (0,5). Se muestran los resultados de la especificidad y sensibilidad de los métodos que incluyen la edad del paciente (edad), la determinación de la concentración de AST, la detección del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2 (HDAC2 rs3778216). Se muestran los datos del poder predictivo de cada variable asociada significativamente: **A**, AUCROC de cada una de las variables asociadas significativamente a fibrosis; **B**, AUCROC de la combinación de variables asociadas significativamente a fibrosis; y **C**, AUCROC de la combinación de variables asociadas significativamente a fibrosis (HDAC2, edad y AST) más los polimorfismos rs2030171 y rs12436555.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad del método de la invención.

Ejemplo 1: Métodos pronósticos de fibrosis hepática grave

Pacientes: El grado de la fibrosis hepática se determinó mediante el estudio anatomopatológico del tejido hepático (procedente de biopsia) y se clasificó el grado de fibrosis mediante la escala METAVIR. La biopsia se extrajo usando una aguja según la técnica de Menghini (HEPAFIX®). En la presente invención se dividió a los 185 pacientes estudiados en dos estadios: fibrosis moderada ($F \leq 2$, $n=138$) y fibrosis grave ($F > 2$, $n=47$).

Materiales y métodos: la infección por virus de la hepatitis C se confirmó mediante la detección de ARN viral en suero de los pacientes, determinándose la carga viral y el genotipo viral usando el kit COBAS AMPLICOR® assay (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ). El resto de parámetros clínicos analizados (ALT, AST y GGT) se determinaron en el laboratorio de rutina de nuestro centro como parte de la práctica clínica habitual del tratamiento y seguimiento de estos pacientes mediante métodos validados (Bergmeyer, H.U. y cols. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986, 24:497-510) para el diagnóstico *in vitro* utilizando el kit Cobas® (Roche) acorde con la federación internacional de química clínica (IFCC). La detección de estos parámetros se realizó a partir de suero o plasma extraído de una muestra de sangre periférica.

Se aisló una muestra de ADN, a partir de una muestra de sangre periférica recogida en un tubo de 10ml anticoagulada con EDTA, utilizando el kit de extracción Magna Pure DNA Isolation kit® (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra de ADN se almacenó a -80°C hasta su uso.

El genotipado de las muestras se realizó utilizando el kit Illumina GoldenGate® Genotyping Assay (Illumina Inc., San Diego, California, USA). En la presente invención se realizó un diseño del chip del ADN seleccionando polimorfismos localizados en los 11 genes de las histonas deacetilasas. Las secuencias de los genes que codifican para estas enzimas tienen los siguientes número de acceso (NCBI *Reference Sequence*): HDAC1 (NT_032977.9), HDAC2 (NT_025741.15), HDAC3 (NT_029289.11), HDAC4 (NT_022173.11), HDAC5 (NT_010783.15), HDAC6 (NT_079573.4), HDAC7 (NT_029419.12), HDAC8 (NT_011669.17), HDAC9 (NT_007819.17), HDAC10 (NT_011526.7) y HDAC11 (NT_022517.18). En el chip de ADN también se determinaron el SNP rs2030171 del gen

STAT1 (NT_005403.17) y el rs12436555 del gen ISGF3G (NT_026437.12). Los polimorfismos seleccionados para este estudio eran en su mayoría taqSNPs (SNPs usados como marcadores de un haplotipo que incluyen en desequilibrio de ligamiento (LD) varios SNPs asociados, ($r^2 \geq 0,8$) que nos permiten analizar varios SNPs determinando un solo SNP, y que además presentaran una frecuencia del alelo minoritario superior al 5% en la población caucásica. En la Tabla 1 se recogen todos los SNPs que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con un $r^2 \geq 0,8$ para los SNPs rs3778216, rs2030171 y rs12436555, descrito en el proyecto Hapmap para las distintas poblaciones (de Bakker, P.I. y cols. *Nature Genetics* 2005, 37(11):1217-23). En la Tabla 2 se recogen las secuencias de las sondas y cebadores empleados en la detección de los SNPs de interés para esta invención, así como la secuencia que incluye a los polimorfismos estudiados.

Resultados: Tras el estudio de 27 polimorfismos genéticos localizados en 11 genes de las histonas deacetilasas (HDACs) hemos desarrollado un método basado en el valor predictivo de la variante genética del gen HDAC2 (rs3778216), la cual se encuentra asociada significativamente a estadios de fibrosis hepática grave ($F > 2$) en 176 pacientes de HCC (Tabla 3). Se han comparado con otros polimorfismos del mismo gen y otros genes de las HDACs, y los resultados indican que sólo el genotipo G/G de este polimorfismo se asocia de forma independiente y significativa con la probabilidad de presentar estadios graves de fibrosis en estos pacientes ($F > 2$). El método es de alto valor predictivo cuando se combina la detección de este polimorfismo con variables clínicas (AST y edad). En la Tabla 4 se recogen las variables clínicas analizadas en esta invención y su asociación estadística a estadios de fibrosis grave.

El polimorfismo rs3778216 de la HDAC2 muestra asociación significativa con el estadio de fibrosis, tanto en el análisis univariante (Tabla 3 y Figura 1) como cuando se ajusta el análisis por otras variables clínicas (análisis multivariante, Tabla 3). El análisis de regresión logística demostró que el genotipo G/G del rs3778216 ($p < 0,05$) estaba asociado a estadios de fibrosis grave ($F > 2$). El análisis de regresión logística multivariante incluía otras variables clínicas del paciente (edad y AST) asociadas en la literatura científica (Martínez, S.M. y cols. *Aliment Pharmacol Ther* 2001, 33:138-148) con el riesgo de padecer estadios de fibrosis graves en HCC. Para determinar el poder predictivo de cada variable independiente (Figura 2A) y su influencia aditiva (Figura 2B) realizamos los siguientes modelos de regresión logística obteniendo sus correspondientes AUCROC, especificidad y sensibilidad (Tabla 5). Como se puede observar, el modelo que incluye las tres variables (edad, AST y rs3778216 del gen HDAC2) asociadas independientemente a fibrosis ($F > 2$), es el que muestra un mayor valor predictivo (AUC=0,795) con una alta sensibilidad y especificidad (90% y 62%, respectivamente).

Además, cabe indicar que el análisis del modelo anterior, junto a los polimorfismos rs2030171 del gen STAT1 y rs12436555 del gen ISGF3G (Tabla 5), nos permite identificar los pacientes con fibrosis grave ($F > 2$) de forma altamente predictiva (AUC=0,84, sensibilidad 89% y especificidad 73%), como se puede apreciar en la Tabla 6.

Tabla 1. Listado de SNPs en desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,8$) con los polimorfismos rs3778216, rs2030171 y rs12436555 en la población Caucásica de referencia (CEU) del proyecto Hapmap.

Secuencia (NCBI Reference Sequence)	Posición en cromosoma 6	Gen	SNP (NCBI Reference Sequence)	Posición en gen	Alelos (hebra +)	Alelos (hebra -)	Secuencia circundante
NT_025741.15	114280563	HDAC2	rs3778216	intrón	C/T	G/A	SEQ ID NO:1
NT_025741.15	114242899	HDAC2	rs13212298	3' upstream	T/C	A/G	SEQ ID NO:13
NT_025741.15	114248499	HDAC2	rs12665655	3' upstream	G/T	C/A	SEQ ID NO:14
NT_025741.15	114265587	HDAC2	rs13204445	intrón	T/C	A/G	SEQ ID NO:15
NT_025741.15	114274848	HDAC2	rs13204434	intrón	A/G	T/C	SEQ ID NO:16
NT_025741.15	114276024	HDAC2	rs13194921	intrón	T/C	A/G	SEQ ID NO:17
NT_025741.15	114276069	HDAC2	rs13209064	intrón	A/C	T/G	SEQ ID NO:18
NT_025741.15	114282481	HDAC2	rs13213007	intrón	G/A	C/T	SEQ ID NO:19
NT_025741.15	114283388	HDAC2	rs13216873	intrón	A/T	T/A	SEQ ID NO:20
NT_025741.15	114284589	HDAC2	rs12660414	intrón	C/G	G/C	SEQ ID NO:21

NT_025741.15	114288218	HDAC2	rs2025191	intrón	A/G	T/C	SEQ ID NO:22
NT_025741.15	114289913	HDAC2	rs13201727	intrón	T/C	A/G	SEQ ID NO:23
NT_025741.15	114291582	HDAC2	rs1322453	intrón	G/C	C/G	SEQ ID NO:24
Secuencia (NCBI Reference Sequence)	Posición en cromosoma 2	Gen	SNP (NCBI Reference Sequence)	Posición en gen	Alelos (hebra +)	Alelos (hebra -)	Secuencia circundante
NT_005403.17	191869163	STAT1	rs2030171	intrón	G/A	C/T	SEQ ID NO:2
NT_005403.17	191866658	STAT1	rs13029247	intrón	T/C	A/G	SEQ ID NO:25
NT_005403.17	191867332	STAT1	rs10173099	intrón	C/T	G/A	SEQ ID NO:26
NT_005403.17	191873553	STAT1	rs10199181	intrón	T/A	A/T	SEQ ID NO:27
NT_005403.17	191878654	STAT1	rs6745710	intrón	C/G	G/C	SEQ ID NO:28
Secuencia (NCBI Reference Sequence)	Posición en cromosoma 14	Gen	SNP (NCBI Reference Sequence)	Posición en gen	Alelos (hebra +)	Alelos (hebra -)	Secuencia circundante
NT_026437.12	24634825	ISGF3G	rs12436555	intrón	A/G	T/C	SEQ ID NO:3
NT_026437.12	24636025	ISGF3G	rs12432194	3'upstream	T/C	A/G	SEQ ID NO:29
NT_026437.12	24662177	TM9SF1	rs10583	Arg215His	A/G	T/C	SEQ ID NO:30

5 **Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el chip de ADN (Golden Gate Assay, Illumina) para la detección de los polimorfismos rs3778216 (gen HDAC2), rs2030171 (gen STAT1) y rs12436555 (gen ISGF3G).**

SNP	Secuencia	O1	O2	O3
rs3778216	TTTAAATATTTCTTTTCTCC CCAAATAGCTAATTGTCGT GTCTGTATTTGTTTATACAT A[T/C]CCTCATCTTTATCTA CAAAAACATTAAGGCAGCT GTTGCACTTGTGTTATCTG TACTATG (SEQ ID NO:1)	ACTTCGTCAGT AACGGACCCCTT AATGTTTTTGT AGATAAAGATG AGGA (SEQ ID NO:4)	GAGTCGAGGT CATATCGTCCT TAATGTTTTTGT AGATAAAGATG AGGG (SEQ ID NO:5)	ATGTATAAACA AATACAGACAC GACATGGTCAC CACGCTTTGCA CGAGTCTGCCT ATAGTGAGTC (SEQ ID NO:6)
rs2030171	GTTACTCCAGACCCCAGAG CAAAGAAAAGTCTTCTGCT CAGGAAGGGGGTCCCTTTC CAAT[A/G]GAGTGAGCAGT TGCCAAGTAAGGGAATAG GCACTCCATGGGTGTGAGA AGTTCCAGCCA (SEQ ID NO:2)	ACTTCGTCAGT AACGGACGAG GAAGGGGGTTC CTTTCCAATA (SEQ ID NO:7)	GAGTCGAGGT CATATCGTGAG GAAGGGGGTTC CTTTCCAATG (SEQ ID NO:8)	AGTGAGCAGTT GTCCAAGTAAG TGCGTTGCGAC TACCGATACGT GTCTGCCTATA GTGAGTC (SEQ ID NO:9)
rs12436555	GGCACATCTGAGTTAGCAG CCAGGGCTGCTACCTGGG AGGACTCTAAACTCTCCCA GCAGAGAGCTTGT[C/A/G]G GCTGTGCTGTGATCTGCTA CTTCTAAGCACTTATATGA GGCAGGGGCACCCTTTCC TATTTGCACATGG (SEQ ID NO:3)	ACTTCGTCAGT AACGGACACTC TCCCAGCAGA GAGCTTGTCA (SEQ ID NO:10)	GAGTCGAGGT CATATCGTACT CTCCCAGCAGA GAGCTTGTCC (SEQ ID NO:11)	GCTGTGCTGTG ATCTGCTACTC GTAAGGTGGC GTGACGACTAA GTCTGCCTATA GTGAGTC (SEQ ID NO:12)

En el apartado secuencia está recogida la secuencia anterior y posterior que flanquean al polimorfismo, está resaltado en negrita el nucleótido en el que se produce el polimorfismo. Los oligonucleótidos O1 y O2 son complementarios al nucleótido que causa el polimorfismo y O3 es un oligonucleótido específico de locus.

5 **Tabla 3. Análisis de regresión logística para HDAC.**

GEN	SNP	GENO		F≤2	F>2	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
		TIPO							
HDAC1	rs1741981	A/A		62 (45,3%)	19 (42,2%)	1	0,63	ns	ns
		A/G		66 (48,2%)	21 (46,7%)	1,04 (0,51-2,11)			
		G/G		9 (6,6%)	5 (11,1%)	1,81 (0,54-6,07)			
HDAC2	rs9481408	G/G		76 (55,5%)	19 (42,2%)	1	0,13	ns	ns
		A/G		47 (34,3%)	23 (51,1%)	1,96 (0,96-3,97)			
		A/A		14 (10,2%)	3 (6,7%)	0,86 (0,22-3,29)			
	rs2243356	T/T		45 (33,8%)	12 (28,6%)	1	0,36	ns	ns
		A/T		65 (48,9%)	18 (42,9%)	1,04 (0,46-2,37)			
		A/A		23 (17,3%)	12 (28,6%)	1,96 (0,76-5,03)			
	rs13203445	A/A		47 (34,8%)	13 (29,6%)	1	0,35	ns	ns
		A/G		65 (48,1%)	19 (43,2%)	1,06 (0,48-2,35)			
		G/G		23 (17%)	12 (27,3%)	1,89 (0,74-4,78)			
rs3778216	A/A		70 (53%)	15 (34,1%)	1	0,028	1	2,23 (1,01-4,89)	0,045
	G/G		62 (47%)	29 (65,9%)	2,2 (1,07-4,35)				
HDAC3	rs1421896	C/C		45 (37,8%)	14 (35%)	1	0,18	ns	ns
		A/C		53 (44,5%)	23 (57,5%)	1,39 (0,64-3,03)			
		A/A		21 (17,6%)	3 (7,5%)	0,46 (0,12-1,77)			
	rs976552	A/A		78 (60,9%)	25 (54,4%)	1	0,36	ns	ns
		A/C		43 (33,6%)	20 (43,5%)	1,45 (0,72-2,91)			
		C/C		7 (5,5%)	1 (2,2%)	0,45 (0,05-3,80)			
	rs2530223	G/G		50 (36,8%)	16 (35,6%)	1	0,12	ns	ns
		A/G		62 (45,6%)	26 (57,8%)	1,31 (0,63-2,71)			
		A/A		24 (17,6%)	3 (6,7%)	0,39 (0,10-1,47)			
HDAC4	rs4852010	G/G		55 (40,4%)	21 (47,7%)	1	0,68	ns	ns
		A/G		65 (47,8%)	19 (43,2%)	0,77 (0,37-1,57)			
		A/A		16 (11,8%)	4 (9,1%)	0,65 (0,20-2,19)			
	rs895808	A/A		50 (37,9%)	24 (52,2%)	1	0,23	ns	ns
		A/C		57 (43,2%)	16 (34,8%)	0,58 (0,28-1,22)			
		C/C		25 (18,9%)	6 (13%)	0,50 (0,18-1,38)			
HDAC5	rs850857	G/G		38 (28,6%)	14 (30,4%)	1	0,58	ns	ns
		A/G		63 (47,4%)	18 (39,1%)	0,78 (0,35-			

ES 2 422 874 A1

		A/A	32 (24,1%)	14 (30,4%)	1,19 (0,49-2,86)			
	rs368328	A/A	55 (45,8%)	18 (47,4%)	1			
		A/G	51 (42,5%)	17 (44,7%)	1,02 (0,47-2,19)	0,8	ns	ns
		G/G	14 (11,7%)	3 (7,9%)	0,65 (0,17-2,54)			
HDAC6	rs2075840W	A/A	2 (4,1%)	0 (%)	NA			
		A/G	16 (32,6%)	3 (17,6%)	1			
		G/G	31 (63,3%)	14 (82,4%)	0,48 (0,11-2,06)	0,326	ns	ns
	rs2075840M	A/A	13 (14,9%)	3 (11,5%)	1			
		G/G	74 (85,1%)	23 (88,5%)	0,56 (0,12-2,73)	0,47	ns	ns
HDAC7	rs2408874	G/G	64 (53,3%)	21 (50%)	1			
		A/G	46 (38,3%)	17 (40,5%)	1,13 (0,54-2,37)	0,9	ns	ns
		A/A	10 (8,3%)	4 (9,5%)	1,22 (0,35-4,30)			
	rs11831940	G/G	63 (46,7%)	17 (36,2%)	1			
		A/G	59 (43,7%)	27 (57,5%)	1,70 (0,84-3,43)	0,26	ns	ns
		A/A	13 (9,6%)	3 (6,4%)	0,86 (0,22-3,35)			
	rs13632	G/G	70 (52,6%)	23 (50%)	1			
		A/G	52 (39,1%)	18 (39,1%)	1,05 (0,52-2,15)	0,86	ns	ns
		A/A	11 (8,3%)	5 (10,9%)	1,38 (0,43-4,40)			
HDAC8	rs1475091W	A/A	24 (49,0%)	14 (73,7%)	1			
		A/G	21 (42,8%)	5 (26,3%)	0,67 (0,32-1,41)	0,28	ns	ns
		G/G	4 (8,2%)	0 (0%)	NA			
	rs1475091M	A/A	64 (74,4%)	19 (73,1%)	1			
		G/G	22 (25,6%)	6 (26,9%)	1,11 (0,37-3,25)	0,87	ns	ns
	rs5912136W	C/G	20 (42,5%)	6 (33,3%)	1			
		G/G	27 (57,5%)	12 (66,6%)	0,48 (0,11-2,06)	0,92	ns	ns
	rs5912136M	G/G	88 (100%)	26 (100%)	NA	NA	NA	NA
	rs3012653W	A/A	12 (24,5%)	7 (36,8%)	1			
		A/C	22 (44,9%)	7 (36,8%)	0,86 (0,22-3,35)	0,71	ns	ns
		C/C	15 (30,6%)	5 (26,4%)	0,74 (0,14-3,76)			
	rs3012653M	A/A	50 (56,8%)	12 (46,1%)	1			
		C/C	38 (43,2%)	14 (53,9%)	0,60 (0,23-1,56)	0,29	ns	ns
HDAC9	rs801524	G/G	91 (66,9%)	28 (59,6%)	1			
		A/G	39 (28,7%)	16 (34%)	1,33 (0,65-2,74)	0,64	ns	ns
		A/A	6 (4,4%)	3 (6,4%)	1,62 (0,38-6,92)			

ES 2 422 874 A1

HDAC10	rs4838866	G/G	99 (72,8%)	33 (75%)	1	0,95	ns	ns
		A/G	34 (25%)	10 (22,7%)	0,88 (0,39-1,98)			
		A/A	3 (2,2%)	1 (2,3%)	1,00 (0,10-9,95)			
	rs1555048	G/G	70 (52,2%)	19 (43,2%)	1	0,09	ns	ns
		A/G	56 (41,8%)	25 (56,8%)	1,64 (0,82-3,29)			
		A/A	8 (6%)	0 (0%)	NA			
	rs34402301	G/G	114 (86,4%)	37 (84,1%)	1	0,67	ns	ns
		A/G	17 (12,9%)	7 (15,9%)	1,27 (0,49-3,30)			
		A/A	1 (0,8%)	0 (0%)	NA			
rs2341111	G/G	69 (53,5%)	18 (41,9%)	1	0,055	ns	ns	
	G/C	52 (40,3%)	25 (58,1%)	1,84 (0,91-3,73)				
	C/C	8 (6,2%)	0 (0%)	NA				
HDAC11	rs2655217	G/G	46 (34,9%)	14 (34,1%)	1	0,67	ns	ns
		A/G	62 (47%)	17 (41,5%)	0,90 (0,40-2,01)			
		A/A	24 (18,2%)	10 (24,4%)	1,37 (0,53-3,54)			
	rs1116048	G/G	85 (62,5%)	31 (70,5%)	1	0,59	ns	ns
		A/G	45 (33,1%)	11 (25%)	0,67 (0,31-1,46)			
		A/A	6 (4,4%)	2 (4,5%)	0,91 (0,18-4,77)			
	rs2655218	G/G	43 (33,3%)	13 (29,6%)	1	0,72	ns	ns
		A/G	61 (47,3%)	20 (45,5%)	1,08 (0,49-2,41)			
		A/A	25 (19,4%)	11 (25%)	1,46 (0,57-3,73)			

Tabla 4. Análisis de regresión logística para factores clínicos.

Factores clínicos		F≤2	F>2	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
GV1	1	103 (75,18%)	40 (85,11%)	1	0,16	ns	ns
	No 1	34 (24,82%)	7 (14,89%)	0,53 (0,22-1,29)			
Edad (años)	≤40	56 (40,88%)	10 (21,28%)	1	0,018	2,64 (1,12-6,20)	0,026
	>40	81 (59,12%)	37 (78,72%)	2,50 (1,17-5,56)			
Carga viral basal (IU/mL)	≤600000	36 (26,28%)	11 (23,40%)	1	0,7	ns	ns
	>600000	101 (73,72%)	36 (76,60%)	1,17 (0,54-2,53)			
ALT basal (U/L)	≤40	30 (21,74%)	2 (4,25%)	1	0,01	ns	ns
	>40	108 (78,26%)	45 (95,75%)	6,25 (1,43-27,26)			
AST basal (U/L)	≤40	70 (50,72%)	4 (8,51%)	1	7,2·10 ⁻⁷	14,12 (4,09-	2,7·10⁻⁵
	>40	68	43	7,67 (3,43-17,17)			

		(49,28%)	(91,49%)			48,74)	
GGT basal (U/L)	≤30	52 (38,24%)	7 (14,89%)	1			
	>30	84 (61,76%)	40 (85,11%)	3,54 (1,48-8,48)	0,005	ns	ns

Tabla 5. Áreas bajo la curva de los distintos modelos de regresión logística.

Variables	AUC	IC al 95%	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
EDAD	0,600	0,507-0,693	77	43
AST	0,718	0,640-0,796	93	50
HDAC2	0,593	0,497-0,689	66	53
STAT1	0,643	0,542-0,745	67	62
ISGF3G	0,568	0,459-0,677	36	77
EDAD + AST	0,771	0,695-0,848	75	72
HDAC2 + EDAD	0,645	0,556-0,734	77	43
HDAC2 + AST	0,763	0,689-0,837	93	50
HDAC2+STAT1	0,705	0,613-0,797	68	63
HDAC2+ISGF3G	0,661	0,561-0,760	74	51
STAT1+ISGF3G	0,699	0,605-0,793	86	48
HDAC2+ EDAD + AST	0,795	0,722-0,868	90	62
HDAC2 + STAT1 + ISGF3G	0,727	0,639-0,814	80	54
HDAC2 + STAT1 + ISGF3G + EDAD	0,759	0,680-0,838	94	46
STAT1 + ISGF3G + AST + EDAD	0,822	0,752-0,896	92	61
HDAC2 + STAT1 + AST + EDAD	0,820	0,746-0,894	78	76
HDAC2 + ISGF3G + AST + EDAD	0,823	0,753-0,892	83	70
HDAC2 + STAT1 + ISGF3G + AST + EDAD	0,844	0,776-0,912	89	73

5 AUC, área bajo la curva (“Area Under the Curve”) calculado mediante el análisis ROC de las probabilidades pronosticadas de cada uno de los modelos de regresión logística.

Tabla 6. Factores significativamente asociados a estadios de fibrosis elevados.

Variables	OR	IC 95,0%	p
rs2030171 genotipo G/G	3,7	1,5-9,4	0,005
rs3778216 genotipo G/G	2,6	1,1-6,8	0,051
rs12436555 alelo A	3,1	1,1-8,3	0,028
AST > 40 U/L	11,5	3,1-42,4	2,4x10 ⁻⁴
Edad > 40 años	3,0	1,1-8,1	0,032

La asociación a F>2 se expresa como *Odd ratio* (OR), intervalo de confianza al 95% (IC 95%) y valor de p calculado mediante regresión logística.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* de obtención de datos útiles para el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave caracterizado por la detección de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC2 seleccionado de la lista que comprende: rs3778216, rs13209064, rs13213007, rs13201727, rs13216873, rs13194921, rs13204434, rs12665655, rs13204445, rs12660414, rs2025191, rs1322453 y rs13212298 en la muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis crónica C.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 que además comprende asociar el genotipo G/G del polimorfismo genético rs3778216, el genotipo A/A del polimorfismo genético rs13212298, el genotipo C/C del polimorfismo genético rs12665655, el genotipo A/A del polimorfismo genético rs13204445, el genotipo T/T el polimorfismo genético rs13204434, el genotipo A/A del polimorfismo genético rs13194921, el genotipo T/T del polimorfismo genético rs13209064, el genotipo C/C del polimorfismo genético rs13213007, el genotipo T/T del polimorfismo genético rs13216873, el genotipo G/G del polimorfismo genético rs12660414, el genotipo T/T del polimorfismo genético rs2025191, el genotipo A/A del polimorfismo genético rs13201727, o el genotipo C/C del polimorfismo genético rs1322453 del gen HDAC2 a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave.
- 20 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde el polimorfismo genético del gen HDAC2 es rs3778216.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde además se detectan los niveles de aspartato aminotransferasa (AST).
- 25 5. Método según la reivindicación 4 donde la asociación a un diagnóstico de fibrosis hepática grave se obtiene si los valores de AST son superiores a 40 U/L.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde la asociación a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave se obtiene si la edad del paciente es superior a 40 años.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde además se detecta al menos un polimorfismo genético del gen STAT1 seleccionado de la lista que comprende: rs2030171, rs13029247, rs10173099, rs10199181, y rs6745710.
- 35 8. Método según la reivindicación 7 donde la asociación a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave se obtiene cuando además el sujeto es portador del genotipo G/G del polimorfismo genético rs2030171, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs13029247, del genotipo C/C del polimorfismo genético rs10173099, del genotipo T/T del polimorfismo genético rs10199181, o del genotipo C/C del polimorfismo genético rs6745710 del gen STAT1.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde el polimorfismo genético del gen STAT1 es rs2030171.
- 45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde además se detecta al menos un polimorfismo genético del gen ISGF3G o del gen TM9SF1 seleccionado de la lista que comprende: rs12436555, rs12432194 y rs10583 para el pronóstico y/o diagnóstico de la fibrosis.
- 50 11. Método según la reivindicación 10 donde la asociación a un pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en el paso (b) se obtiene cuando además el sujeto es portador del alelo A del polimorfismo genético rs12436555 o del alelo T del polimorfismo genético rs12432194 del gen ISGF3G, o del alelo A del polimorfismo genético rs10583 del gen TM9SF1.
- 55 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 donde el polimorfismo genético del gen ISGF3G es rs12436555.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la muestra biológica se selecciona de la lista que comprende tejido, mucosa oral, sangre, plasma, suero y linfa.
- 60 14. Método según la reivindicación 13 donde la muestra biológica es sangre.
15. Método según las reivindicaciones 1 a 14 donde la detección del polimorfismo se realiza mediante sondas de hibridación marcadas con fluoróforos.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 donde el sujeto es un humano.

17. Uso de un kit que comprende las sondas SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 que detectan el polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2 para la obtención de datos útiles para el pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave en un sujeto que padece hepatitis C crónica.
- 5 18. Uso de un kit según la reivindicación 17 que además comprende las sondas SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9 que detectan el polimorfismo genético rs2030171 del gen STAT1, y/o las sondas SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12 que detectan el polimorfismo genético rs12436555 del gen ISGF3G.
19. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18 donde el sujeto es un humano.

FIG.1

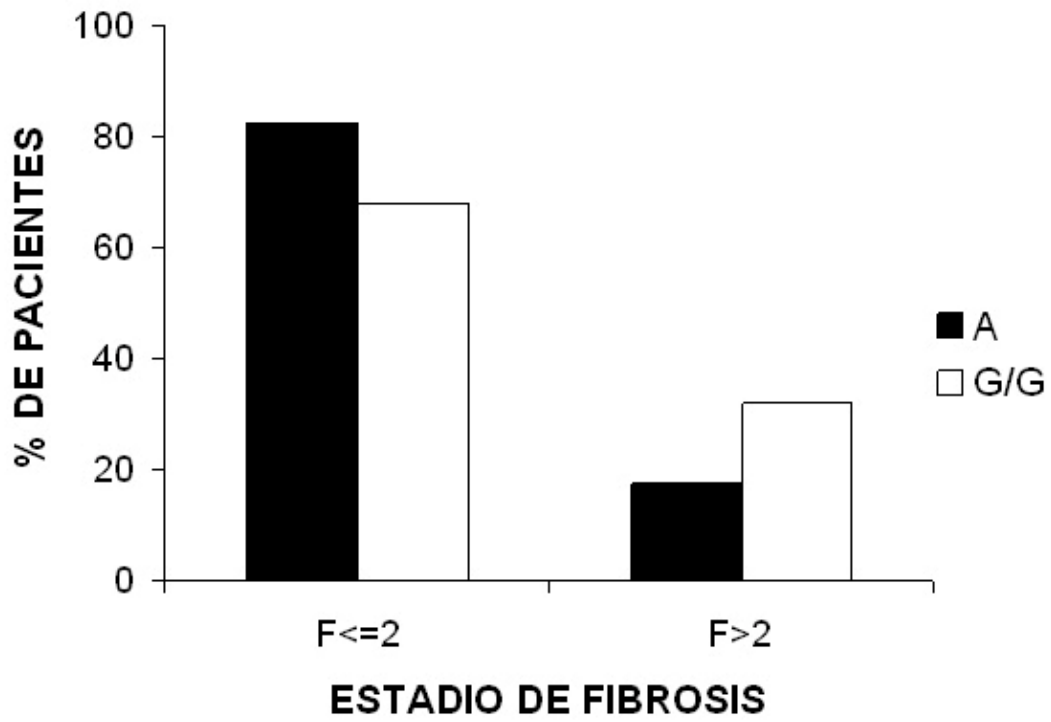


FIG.2 A

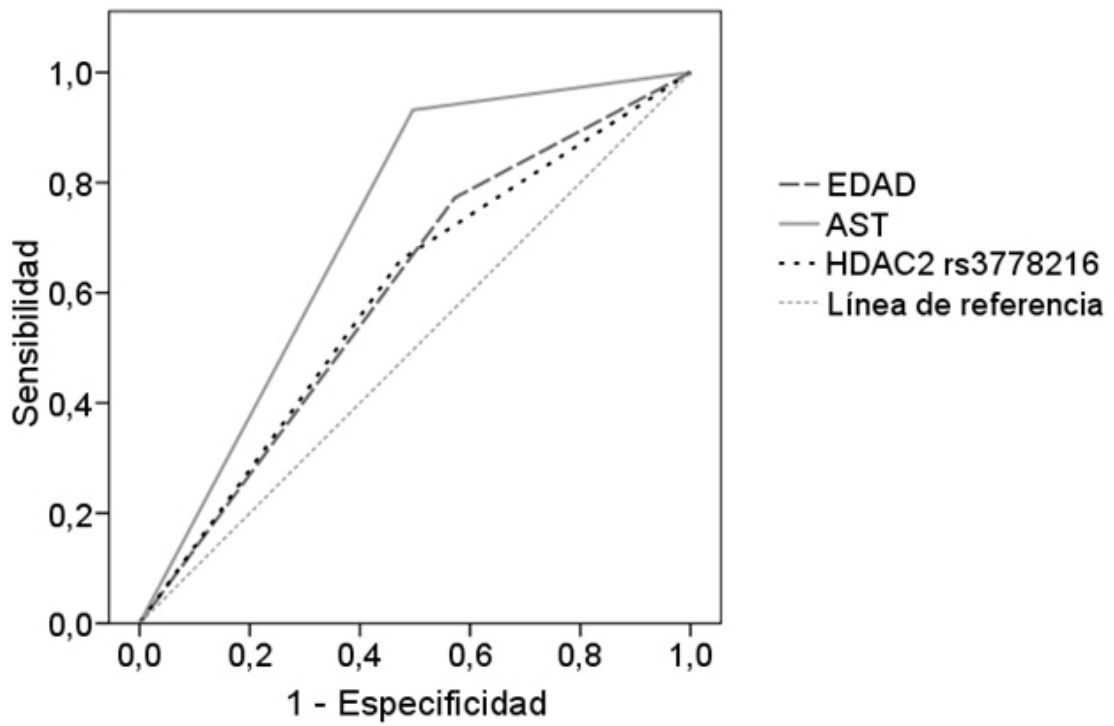


FIG.2 B

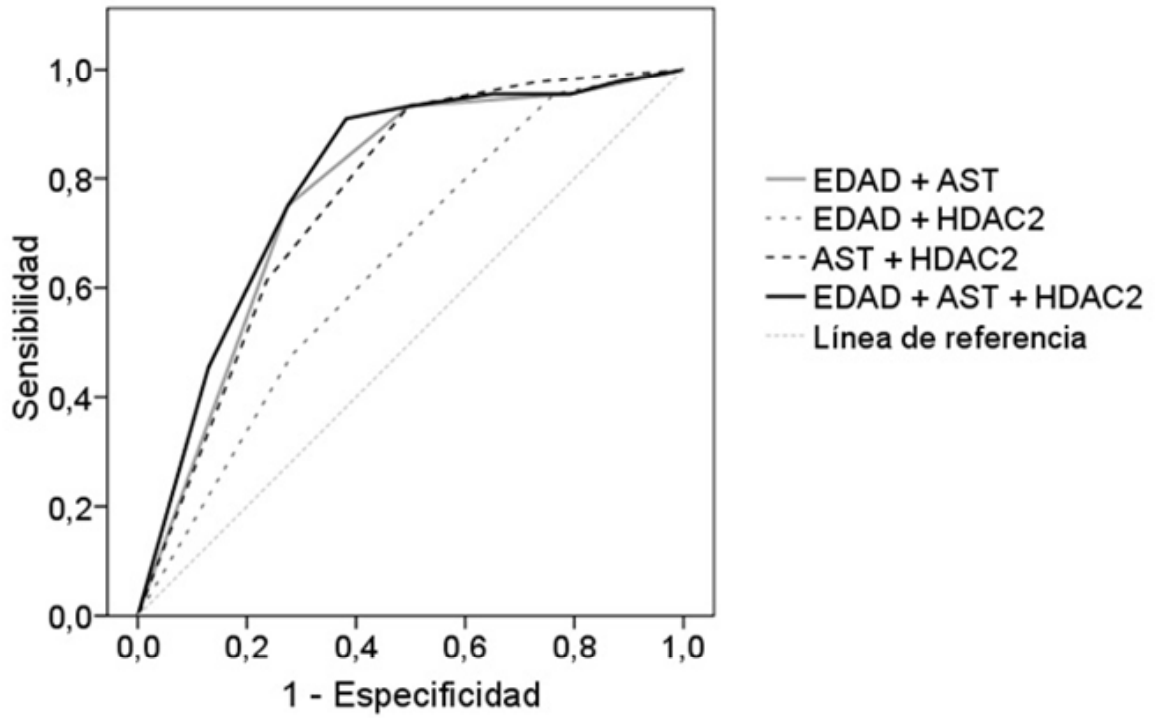
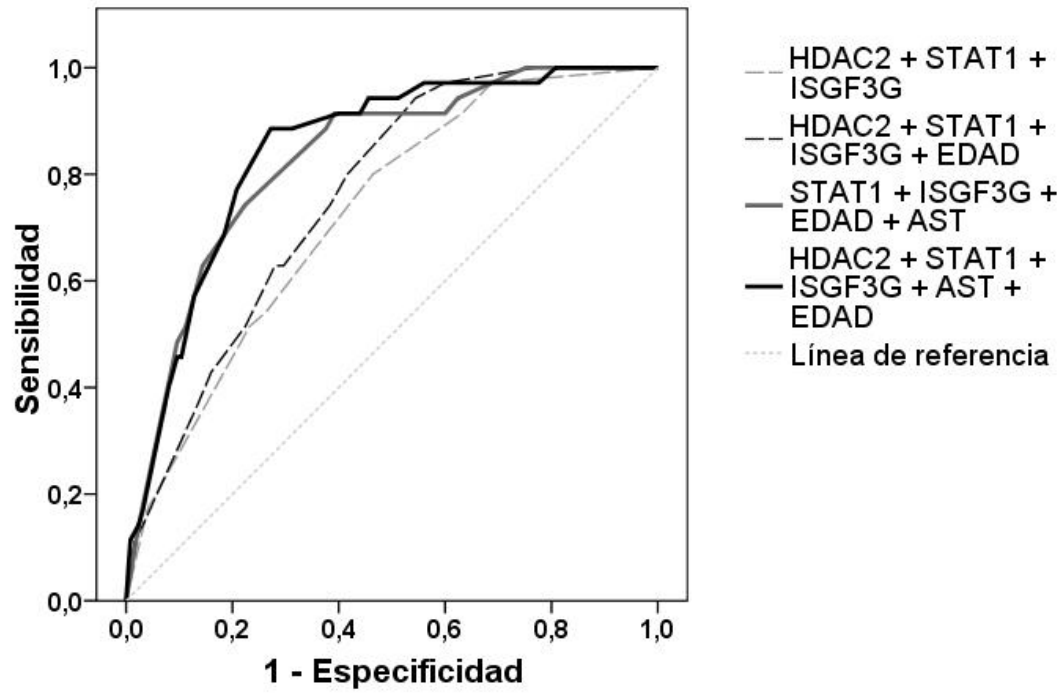


FIG.2 C





- ②① N.º solicitud: 201230368
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007142763 A2 (AP-PLERA [US/US]) 13.12.2007, resumen; página 5, línea 31 – página 8, línea 33; reivindicaciones 1-18.	1-19
A	WO 2005111241 A2 (AP-PLERA CORPORATION [US/US]) 24.11.2005, resumen; página 6, línea 29 – página 10, línea 7; reivindicaciones 1-18.	1-19
A	WO 2010094740 A1 (UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE [FR/FR]) 26.08.2010, resumen; página 4, línea 25 – página 6, línea 11; reivindicaciones 1-13.	1-19
A	WO 0246462 A2 (ISIS INNOVATION LIMITED [GB/GB]) 13.06.2002, páginas 4-7; reivindicaciones 1-5.	1-19

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
27.06.2013

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.06.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	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	WO 2007142763 A2	13.12.2007
D02	WO 2005111241 A2	24.11.2005
D03	WO 2010094740 A1	26.08.2010
D04	WO 0246462 A2	13.06.2002

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

La presente invención divulga un método *in vitro* de pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave mediante la detección del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2, o cualquiera de los que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con él (reivindicaciones 1-16). Se refiere también a un kit para detección de dicho polimorfismo (reivindicaciones 17-19).

El documento D01 divulga una serie de polimorfismos genéticos como marcadores genéticos de diagnóstico y/o pronóstico de fibrosis hepática y otras patologías relacionadas (ver resumen; página 5, línea 31 - página 8, línea 33; reivindicaciones 1-18).

El documento D02 divulga una serie de polimorfismos genéticos como marcadores genéticos de diagnóstico y/o pronóstico de fibrosis hepática (ver resumen; página 6, línea 29 - página 10, línea 7; reivindicaciones 1-18).

El documento D03 divulga una serie de polimorfismos genéticos como marcadores genéticos de predisposición a padecer algún tipo de fibrosis, preferentemente hepática, así como de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad (ver resumen; página 4, línea 25 - página 6, línea 11; reivindicaciones 1-13).

El documento D04 divulga una serie de polimorfismos genéticos de la metaloproteinasa de matriz-2 (MMP-2) como marcadores genéticos de enfermedades, entre las que se encuentra la fibrosis hepática (ver páginas 4-7; reivindicaciones 1-5).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente invención es un método *in vitro* de pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática grave mediante la detección del polimorfismo genético rs3778216 del gen HDAC2, o cualquiera de los que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con él; así como un kit para detección de dicho polimorfismo.

1.1. REIVINDICACIONES 1-19

Los documentos D01 y D02 se consideran los más cercanos al estado de la técnica ya que anticipan unos polimorfismos genéticos como marcadores de fibrosis hepática y su uso en un método *in vitro* para diagnóstico y/o pronóstico de dicha enfermedad.

La diferencia entre los documentos D01 y D02 y el objeto técnico de la invención radica en los propios polimorfismos anticipados como marcadores genéticos de la fibrosis que son diferentes de los reivindicados en la presente solicitud por lo que se consideran como una alternativa diferente a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en D01 D02, las reivindicaciones 1-19 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no son relevantes en relación al objeto de la invención.