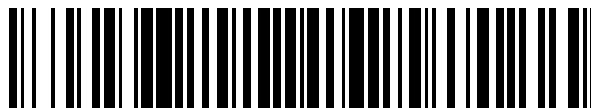


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 154**

21 Número de solicitud: 201230365

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:

17.09.2013

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 cirrosis hepática**

57 Resumen:

Método in vitro de pronóstico de cirrosis hepática.
La presente invención se refiere a un método in vitro de pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis para pacientes que padecen hepatitis crónica C, que se caracteriza por la determinación del genotipo en el polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5, o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él. Adicionalmente puede incluir la determinación de al menos una variable clínica, preferentemente la determinación de la concentración de aspartato aminotransferasa (AST).

MÉTODO *IN VITRO* DE PRONÓSTICO DE CIRROSIS HEPÁTICA

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un método *in vitro* de pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis para pacientes que padecen hepatitis C crónica, que se caracteriza por la determinación del genotipo en el polimorfismo genético rs368328 del gen *HDAC5*, o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él ($r^2 \geq 0,8$). Adicionalmente puede incluir la determinación de al menos una variable clínica, preferentemente la determinación de la concentración de aspartato aminotransferasa (AST).

ESTADO DE LA TÉCNICA

La cirrosis hepática es una patología crónica del hígado que se caracteriza por la muerte progresiva del tejido hepático y su sustitución por tejido fibroso. La acumulación excesiva de matriz extracelular en el parénquima hepático, causada por la sustitución a tejido fibroso, conlleva una alteración estructural y funcional de este órgano. La cirrosis hepática es común en enfermedades crónicas del hígado como son la hepatitis causada por el virus de la hepatitis C (VHC), la hepatitis causada por el virus de la hepatitis B (VHB), la enfermedad de hígado graso no alcohólica y la enfermedad hepática alcohólica, la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson o el déficit de α_1 -antitripsina.

La infección por VHC es una de las principales causas mundiales de enfermedad hepática crónica, afectando aproximadamente a 170 millones de personas. La actual terapia antiviral consiste en interferon-pegilado más ribavirina; sin embargo, se observa una alta variabilidad en la tasa de respuesta obtenida con este tratamiento. Esta variabilidad se debe tanto a factores virales como factores del paciente.

La erradicación del VHC 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.

El fracaso de la terapia tiene importantes repercusiones clínicas debido a que esta enfermedad evoluciona frecuentemente a fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma, complicaciones graves, de costoso manejo y que constituyen la principal causa de trasplante hepático.

Entre los factores del paciente que influyen en el resultado del tratamiento antiviral se encuentran el sexo, la edad o el índice de masa corporal. Además, se han descrito recientemente que distintos polimorfismos en el gen IL-28B, que codifica para el interferón $\lambda 3$, influyen muy significativamente en la respuesta al tratamiento, confirmando la importancia del perfil genético del paciente en la respuesta a estos fármacos.

De forma similar, la progresión y pronóstico de la hepatitis C crónica (HCC) es muy variable entre los distintos pacientes, indicando la relevancia de la variabilidad genética interindividual en la etiopatogenia de la HCC.

El diagnóstico de la fibrosis hepática se ha basado tradicionalmente en el estudio anatomopatológico de la biopsia. Esta se clasifica siguiendo la escala METAVIR, según la cual existen 5 estadios: 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 muestra, interpretación subjetiva y difícil repetición periódica. Por estos motivos, se necesitan tests de diagnóstico no invasivos que puedan reemplazar la biopsia hepática, basados en pruebas indirectas más seguras para el paciente y de menor coste socioeconómico.

Se han descrito distintos modelos que combinan factores de riesgo sérico, como niveles de alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), colesterol, % de plaquetas, bilirrubina, etc. Estas escalas (Fibrotest, Forns, APRI, FIB-4, Hepascore, entre otras) permiten la predicción de estadios graves de fibrosis. La determinación de estos marcadores es sencilla y barata, no obstante estos índices solo permiten determinar el estadio de fibrosis hepática en el momento de realizar el diagnóstico, pero no permiten identificar factores pronósticos de riesgo inherentes al paciente como son los polimorfismos genéticos.

En WO2010/125220 se ha descrito la combinación de marcadores séricos, concretamente la metaloproteínasa 2 (MMP2) y AST, con el recuento de plaquetas de una muestra para el diagnóstico del estadio de fibrosis hepática. Según los autores, la cuantificación de estos tres parámetros permite asociar el aumento de la concentración de MMP2 y AST, junto con el descenso del número de plaquetas, a un estadio de fibrosis mayor o igual a F2 o a un estadio de cirrosis.

Se han realizado distintos estudios genéticos de uno o varios genes candidatos identificándose distintos polimorfismos asociados a fibrosis; no obstante, no se han realizado suficientes réplicas de estos estudios. Recientemente, se ha descrito una región en el gen *IFNGR2*, que incluye distintos polimorfismos (rs9976971, rs10600672, rs2284553 y rs17882748) asociados a estadios de fibrosis hepática 3 y 4 (frente a un grupo comparado de pacientes con estadios de fibrosis 0 y 1). No obstante, este método no analiza la influencia de otras covariables de riesgo asociadas a fibrosis ni establece un modelo predictivo y no tiene en cuenta a los pacientes en estadios intermedios (F=2) (Nalpas, B. y cols. *Gut* 2010, 59:1120-1126).

De forma interesante, Huang y cols. (*Hepatology* 2007, 46:297-306, US2010/0216154A1 y US2011/0129831A1) describieron una escala de riesgo de cirrosis para pacientes con infección crónica por el VHC basado en un algoritmo procedente de la evaluación de siete polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en diversos genes candidatos (*AZIN 1*, *TLR4*, *TRPM5*, *AQP2*, y otros tres polimorfismos en los cromosomas 1, 3 y 15), mostrando la combinación de estos 7 marcadores un AUCROC (AUC, área bajo la curva; ROC, característica operativa del receptor) de 0,73, que se incrementaba hasta 0,76 si se incluían otras variables clínicas. Dicho método ha sido replicado posteriormente por otros autores para estimar la precisión predictiva de esos marcadores de progresión de la HCC a fibrosis hepática y cirrosis, tanto desde estadios leves como desde estadios moderados y graves. Sin embargo, en el primer estudio, solo se validaron estos resultados en varones con un AUCROC de 0,73, mientras que en el segundo estudio no observaron asociación predictiva de la escala basada en los marcadores descritos anteriormente con la evolución clínica a cirrosis (Marcolongo, M. y cols. *Hepatology* 2009, 50(4):1038-44; Curto, T.M. y cols. *Pharmacogenet Genomics* 2011, 21(12):851-60).

En US2006/0024700 se describe un gran número de secuencias que corresponden a polimorfismos genéticos útiles en el pronóstico de la fibrosis hepática. Estos polimorfismos descritos son usados para asociarlos a un aumento o disminución del riesgo de sufrir fibrosis hepática.

En WO2008/076954 se describen compuestos heterocíclicos inhibidores de la acetilación. Dichos compuestos realizan su función actuando sobre proteínas llamadas histona deacetilasas (HDAC), entre las que se incluye HDAC5.

Por tanto, debido a la notable evolución de las enfermedades crónicas del hígado a cirrosis, sobretudo por infección del VHC, existe una clara necesidad de desarrollar métodos alternativos de diagnóstico y pronóstico no invasivos de cirrosis en pacientes con HCC y otras hepatopatías de distinta etiología con mayor capacidad predictiva.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe un método sencillo y preciso de pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis en pacientes que padecen hepatitis C crónica (HCC). Dicho método requiere al menos un marcador genético y puede incluir al menos una variable clínica, presentando altos niveles de AUCROC (AUC, área bajo la curva; ROC, característica operativa del receptor), sensibilidad y especificidad.

El método de pronóstico y diagnóstico de cirrosis en pacientes que padecen HCC de la invención es altamente predictivo, no es invasivo y además, es independiente del estatus del paciente. El marcador genético empleado para evaluar el pronóstico solo requiere una única determinación a lo largo de la vida del paciente.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis, caracterizado por la detección del polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5 o cualquiera de los que se encuentren en desequilibrio de ligamiento con él ($r^2 \geq 0,8$), en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece HCC. La invención se refiere también a métodos para el pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis en sujetos con HCC, que comprenden la detección de al menos uno de dichos polimorfismos y la asociación de un genotipo concreto de dicho polimorfismo con un pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis. La inclusión en el método de la determinación de la concentración de aspartato aminotransferasa (AST) permitiría diagnosticar cirrosis (F=4) con mayor precisión.

En la presente invención se muestran datos de asociación independiente y significativa del genotipo A/A del polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5 con la probabilidad de desarrollar cirrosis en pacientes infectados con virus de la hepatitis C (VHC). La presente invención muestra la utilidad de la determinación del polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5 como marcador para el pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis.

5 En la presente invención se muestran resultados de la utilidad de los métodos de la invención en el pronóstico y/o diagnóstico de cirrosis. El polimorfismo rs368328 del gen HDAC5, se asocia de manera independiente y significativa con la probabilidad de desarrollar cirrosis, en pacientes infectados con el VHC (regresión logística, $p=0,047$).

10 El polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5, número de referencia de la Sociedad de Variaciones Genómicas Humanas ("Human Genome Variation Society", HGVS) NC_000017.10:g.42170289G>A, NM_001015053.1:c.645-115C>T o NM_005474.4:c.642-115C>T, o también denominado rs368328 se refiere a un SNP situado en la posición 42170289 del cromosoma 17 de *Homo sapiens* (número de acceso al *GenBank* (base de datos NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) de la secuencia del cromosoma 17 de *Homo sapiens*: NT_010783.15). El polimorfismo rs368328 se sitúa en un intrón del gen HDAC5. 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 G en el polimorfismo rs368328 es protector, mientras que portar el genotipo A/A incrementa el riesgo de cirrosis. El gen HDAC5 se refiere a la secuencia de polinucleótidos que codifica para la proteína denominada histona deacetilasa 5 (HDAC5) (descrita en NCBI con referencia: NC000017.10, NM_001015053 o NM_005474.4).

25 Dado que el polimorfismo rs368328 presenta utilidad en el pronóstico y/o diagnóstico de la cirrosis, cualquier otro polimorfismo que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él (es decir que se hereda en conjunto con él), presentaría la misma capacidad. El polimorfismo rs368328 del gen HDAC5 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749 con un valor de $r^2 \geq 0,8$ en la población Caucásica. Por lo tanto, cualquiera de estos SNPs puede estar asociado a cirrosis, ya que se heredan en bloque junto con el polimorfismo rs368328 (Tabla 1). Los genotipos asociados al incremento del riesgo de cada uno de estos polimorfismos en desequilibrio de ligamiento con el genotipo A/A del polimorfismo rs368328 son: genotipo G/G del polimorfismo genético rs454192; genotipo G/G del polimorfismo genético rs189050; genotipo G/G del polimorfismo genético rs228746; genotipo C/C del polimorfismo genético rs228749.

Por todos estos motivos, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática caracterizado porque comprende la determinación del genotipo de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749, en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece HCC. 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 es rs368328.

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

El término "diagnóstico" en la presente invención se refiere al procedimiento por el cual se identifica si un sujeto, al que se le aplica el método de la invención, padece cirrosis. El término "diagnóstico" también se refiere a la capacidad de determinar si sujetos previamente diagnosticados de fibrosis hepática han sufrido un empeoramiento de la enfermedad, es decir, si dichos sujetos han desarrollado cirrosis a partir de un estadio de fibrosis ligera o moderada.

En la presente invención se entiende por "pronóstico" la capacidad de detectar pacientes o sujetos asintomáticos que presentan una alta probabilidad de desarrollar cirrosis, aún cuando en el momento del estudio 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 cirrosis.

Un modelo se considera predictivo cuando la AUCROC es mayor de 0,7. 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 cirrosis). El AUCROC por convenio está comprendido entre 0,5 y 1: valores entre 0,5 y 0,7 indican una baja precisión del modelo, mientras que valores de AUCROC superiores a 0,7 se consideran altamente predictivos, más precisos cuanto más cercanos al valor 1. 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 cirrosis (Burgueño MJ et al. *Med Clin (Barc)* 1995, 104:661-670).

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.

- 5 Los términos "cirrosis hepática" o "cirrosis" se refieren al acúmulo de fibras de matriz extracelular, por ejemplo colágeno, que sucede en las enfermedades hepáticas crónicas que provocan una alteración funcional y estructural en el hígado. Esta definición, en la presente invención corresponde al estadio F=4 según la escala METAVIR. La fibrosis hepática se clasifica siguiendo la escala METAVIR, según la cual existen 5 estadios: F0 o fibrosis ausente, donde el hígado no presenta fibrosis; F1 o fibrosis ligera, se refiere a la fibrosis portal sin septos
10 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 la cirrosis hepática (F4) el más grave.

- 15 En la presente invención "hepatitis C crónica" (HCC) se refiere a la enfermedad hepática causada por infección del VHC 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).

- 20 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
25 haplotipo si son SNP etiquetas o "tagSNP".

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.

- 30 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 $r^2 > 0,8$ y que se identifican mediante el genotipado de uno de los polimorfismos incluidos en dicho haplotipo.

- 35 "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).

- 40 " 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, genotipar 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 $r^2 \geq 0,8$ seríamos capaces de ver prácticamente todos los SNPs de un
45 haplotipo mediante el genotipado de su tagSNP (de Bakker, P.I. y cols. *Nature Genetics* 2005, 37(11):1217-23).

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.

- 50 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.

- 55 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.

- 60 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.

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.

5 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.

10 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.

15 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
20 complementario, generalmente, mediante electroforesis, permite determinar la secuencia de nucleótidos.

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.

25 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).

30 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.

35 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.

40 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
45 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.

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.

55 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.

60 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 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.

5 Se entiende por "sujeto" aquel individuo susceptible de padecer cirrosis. Preferentemente el sujeto es un humano.

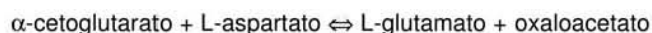
10 Cualquiera de los métodos descritos en la presente invención, pueden comprender la determinación de otras variables clínicas, como por ejemplo, aunque sin limitarse, edad, sexo, determinación de transaminasas como por ejemplo la aspartato aminotransferasa (AST, o también llamada transaminasa glutámico oxalacética (GOT), alanina aminotransferasa (ALT, o también denominada transaminasa glutámico pirúvica, GPT), recuento plaquetario, nivel de albumina, o la carga viral (preferentemente carga viral del VHC) en el caso de hepatopatías causadas por virus.

15 Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde además se determina la concentración de aspartato aminotransferasa (AST) en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece HCC.

20 En la presente invención se ha observado que el valor predictivo del método de pronóstico y/o diagnóstico de fibrosis hepática caracterizado por la detección del polimorfismo rs368328 o cualquiera que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con él ($r^2 \geq 0,8$), es mayor cuando se determina también la concentración de aspartato aminotransferasa (AST) en una muestra biológica del mismo sujeto al que se le realiza la determinación del genotipo del polimorfismo rs368328 o cualquiera que se encuentre en desequilibrio con él.

25 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).

30 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
35 enzima AST cataliza esta reacción de equilibrio:



40 La enzima AST cataliza esta reacción de equilibrio, el incremento de oxaloacetato se determina en la reacción indicadora que es catalizada por la malato-deshidrogenasa:



45 NADH se oxida a NAD^+ . La tasa de disminución de NADH, que se mide fotométricamente, es directamente proporcional a la tasa de formación de oxaloacetato y con ello, a la actividad de AST.

En un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la cirrosis hepática de un sujeto que padece HCC que comprende las siguientes etapas:

- 50 a. la determinación del genotipo en al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749, en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece HCC,
- b. la asociación del genotipo A/A en el polimorfismo genético rs368328, del genotipo G/G en el polimorfismo genético rs454192, del genotipo G/G en el polimorfismo genético rs189050, del genotipo G/G en el polimorfismo genético rs228746, o del genotipo C/C en el polimorfismo genético rs228749, del
55 gen HDAC5 determinado en la etapa (a) a un diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde en el paso (b) el genotipo que se asocia a un diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática es el genotipo A/A del polimorfismo genético rs368328.

60 Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método que además comprende las siguientes etapas:

- c. la determinación de la concentración de AST en una muestra biológica aislada del mismo sujeto de la etapa (a),

- d. la asociación de valores de concentración de AST superiores a 40 U/L a un diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática.

5 Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la determinación de la concentración de AST se realiza en la misma muestra biológica que la determinación del genotipo del polimorfismo del gen HDAC5. Preferiblemente la muestra biológica es sangre.

10 Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la determinación de la concentración de AST se realiza en una muestra biológica distinta que la determinación del genotipo del polimorfismo del gen HDAC5.

15 Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al método donde la muestra biológica en la que se determina la concentración de AST es sangre y la muestra biológica en la que se determina el genotipo del polimorfismo del gen HDAC5 se selecciona de la lista que comprende un tejido o un fluido biológico. En una realización aún más preferida, el tejido es mucosa oral.

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde el fluido biológico se selecciona de entre sangre, plasma, suero y linfa. En una realización más preferida, el fluido biológico es sangre.

20 Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al método donde la determinación del genotipo se realiza mediante sondas de hibridación marcadas con fluoróforos.

25 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.

30 La secuencia detectada en los ejemplos de la presente invención para la detección del polimorfismo genético 368328 es (SEQ ID NO: 1) donde "r" en la posición 251 indica que puede ser [A/G], que es el polimorfismo rs368328 reconocido por sondas que hibridan por complementariedad de bases (T/C). 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 (SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO: 7) 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 (SEQ ID NO: 8) sirve como control de especificidad de locus e hibrida varias bases corriente abajo del polimorfismo (sentido 3'). Tras la hibridación se realiza una PCR que permite elongar la

35 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.

40 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

45 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.

55 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

60 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.

- 5 Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde el sujeto es un humano.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749 como
10 marcador pronóstico de cirrosis hepática de un sujeto que padece HCC. En la presente invención, se entiende por "marcador pronóstico", aquel polimorfismo que sirve como indicador de pronóstico de cirrosis. En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el polimorfismo genético del gen HDAC5 es rs368328. En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el polimorfismo se usa en combinación con la determinación de la concentración de AST. Preferiblemente, el sujeto que padece HCC es un humano.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende sondas que permiten determinar el genotipo en al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749 para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la cirrosis hepática en un sujeto que padece HCC.

20 El polimorfismo rs454192 [A/G] del gen HDAC5 se localiza en la posición 251 de SEQ ID NO: 2, y puede ser A o G. El polimorfismo rs189050 [C/G] del gen HDAC5 se localiza en la posición 598 de SEQ ID NO: 3, y puede ser C o G. El polimorfismo rs228746 [A/G] del gen HDAC5 se localiza en la posición 861 de SEQ ID NO: 4, y puede ser A o G. El polimorfismo rs228749 [C/T] del gen HDAC5 se localiza en la posición 201 de SEQ ID NO: 5, y puede ser A o G.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el kit comprende sondas que permiten determinar el polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5 para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la cirrosis hepática en un sujeto que padece HCC. Preferiblemente, el sujeto es un
30 humano.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el kit además comprende los elementos necesarios para determinar la concentración de AST.

35 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,
40 que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, los kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

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,
45 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
50 para llevar a cabo el método de la invención.

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,
55 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

60 **Figura 1.- El polimorfismo rs368328 del gen HDAC5 se asocia con la cirrosis.** Se muestran los resultados de 157 pacientes con HCC con fibrosis hepática leve, moderada o grave (F0-3, n=143) y cirrosis (F=4, n=14). G, portadores de al menos un alelo G (guanina, n=84); A/A, portadores de los dos alelos A (adenina, n=73).

Figura 2.- AUROC de métodos pronóstico de cirrosis hepática. Se muestra la línea de referencia que representa el valor mínimo de AUCROC (0,5) y los resultados de la especificidad y sensibilidad de los métodos que incluyen la determinación de la concentración de AST y de la detección del polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5 por separado y en combinación. El poder predictivo de cada variable asociada significativamente a AUCROC de cada una de las variables asociadas a cirrosis y de la combinación de variables asociadas a cirrosis de forma sinérgica.

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 de diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis.

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=0-3, n=165) y fibrosis grave (F=4, n=20).

Materiales y métodos: la infección por VHC 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 10 ml 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). 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, $r^2 > 0,8$) 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 el SNP rs368328 del gen HDAC5, descrito en el proyecto Hapmap para las distintas poblaciones (de Bakker, P.I. y cols. *Nature Genetics* 2005, 37(11):1217-23). Como se ha descrito arriba, el polimorfismo rs368328 del gen HDAC5 se localiza en la posición 251 de SEQ ID NO: 1; el polimorfismo rs454192 del gen HDAC5 se localiza en la posición 251 de SEQ ID NO: 2; el polimorfismo rs189050 del gen HDAC5 se localiza en la posición 598 de SEQ ID NO: 3; el polimorfismo rs228746 del gen HDAC5 se localiza en la posición 861 de SEQ ID NO: 4; el polimorfismo rs228749 del gen HDAC5 se localiza en la posición 201 de SEQ ID NO: 5.

Tabla 1.- Listado de SNPs en desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,8$) con el polimorfismo rs368328 del gen HDAC5 en la población Caucásica de referencia en el proyecto Hapmap. Todos están en intrones.

Secuencia NCBI	Posición en cromosoma 17	SNP	Alelos (hebra +)	Alelos (hebra -)	Secuencia circundante
NT 010783.15	42170289	rs368328	A/G	T/C	SEQ ID NO: 1
NT 010783.15	42171206	rs454192	A/G	T/C	SEQ ID NO: 2
NT 010783.15	42173252	rs189050	C/G	G/C	SEQ ID NO: 3
NT 010783.15	42173752	rs228746	A/G	T/C	SEQ ID NO: 4
NT 010783.15	42174570	rs228749	C/T	G/A	SEQ ID NO: 5

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 del polimorfismo rs368328 de la variante genética del gen HDAC5, la cual se encuentra asociada significativamente al estadio de cirrosis (F=4) en 157 pacientes de HCC (tabla 2). Se han comparado con otros polimorfismos del mismo gen y otros genes de las HDACs, y los resultados indican que solo el genotipo A/A de este polimorfismo se asocia de forma independiente y significativa con la probabilidad de presentar cirrosis (F=4) en estos pacientes. El método es de alto valor predictivo cuando se combina la detección de este polimorfismo con la variable clínica AST. En la tabla 3 se recogen las variables clínicas analizadas en esta invención y su asociación estadística a estadio cirrótico.

Tabla 2.- Análisis de regresión logística para HDAC.

GEN	SNP	GENOTIPO	F≤3	F=4	Univariante OR (95%CI)	p
HDAC1	rs1741981	A/A	73 (45,1%)	8 (40%)	1	0,75
		A/G	76 (46,9%)	11 (55%)	1,32 (0,50-3,47)	
		G/G	13 (8%)	1 (5%)	0,70 (0,08-6,09)	
HDAC2	rs9481408	G/G	85 (52,5%)	10 (50%)	1	0,09
		A/G	60 (37%)	10 (50%)	1,42 (0,56-3,61)	
		A/A	17 (10,5%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	
	rs2243356	T/T	54 (34,4%)	3 (17,6%)	1	0,17
		A/T	75 (47,8%)	8 (47,1%)	1,92 (0,49-7,57)	
		A/A	28 (17,8%)	6 (35,3%)	3,86 (0,90-16,59)	
	rs13203445	A/A	57 (35,4%)	4 (22,2%)	1	0,25
		A/G	76 (47,2%)	8 (44,4%)	1,50 (0,43-5,23)	
		G/G	28 (17,4%)	6 (33,3%)	3,05 (0,80-11,70)	
	rs3778216	G/G	78 (49,7%)	12 (63,2%)	1	0,47
		A/G	63 (40,1%)	5 (26,3%)	0,52 (0,17-1,54)	
		A/A	16 (10,2%)	2 (10,5%)	0,81 (0,17-3,99)	
HDAC3	rs1421896	C/C	52 (36,6%)	6 (35,3%)	1	0,37
		A/C	66 (46,5%)	11 (64,7%)	1,44 (0,50-4,17)	
		A/A	24 (16,9%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	
	rs976552	A/A	89 (57,8%)	13 (65%)	1	0,79
		A/C	58 (37,7%)	6 (30%)	0,71 (0,25-1,97)	
		C/C	7 (4,5%)	1 (5%)	0,98 (0,11-8,61)	

HDAC4	rs2530223	G/G	59 (36,4%)	6 (31,6%)	1 1,68 (0,60-4,69)	0,47
		A/G	76 (46,9%)	13 (68,4%)	0,00	
		A/A	27 (16,7%)	0 (0%)	(0,00-NA)	
	rs4852010	G/G	66 (41%)	10 (52,6%)	1 0,69 (0,26-1,84)	0,57
		A/G	77 (47,8%)	8 (42,1%)	0,37	
		A/A	18 (11,2%)	1 (5,3%)	(0,04-3,06)	
	rs895808	A/A	62 (39%)	12 (63,2%)	1 0,37 (0,12-1,12)	0,13
		A/C	69 (43,4%)	5 (26,3%)	0,37	
		C/C	28 (17,6%)	2 (10,5%)	(0,08-1,76)	
HDAC5	rs850857	G/G	48 (30,2%)	4 (20%)	1 1,32 (0,38-4,61)	0,3
		A/G	73 (45,9%)	8 (40%)	2,53	
		A/A	38 (23,9%)	8 (40%)	(0,71-9,03)	
	rs368328	A/G-G/G	80 (55,9%)	4 (28,6%)	1 3,12 (0,95-11,1)	0,047
		A/A	63 (44,1%)	10 (71,4%)		
HDAC6	rs2075840W	A/A	2 (3,4%)	0	1 0,47 (0,06-3,75)	0,57
		A/G	18 (31,0%)	1 (14,3%)	1,57	
		G/G	38 (65,6%)	6 (85,7%)	(0,41-6,04)	
	rs2075840M	A/A	14 (13,7%)	3 (25%)	1 0,56 (0,12-2,73)	0,47
		G/G	88 (86,3%)	9 (75%)		
HDAC7	rs2408874	G/G	75 (52,1%)	10 (58,8%)	1 0,65 (0,21-2,00)	0,63
		A/G	58 (40,3%)	5 (29,4%)	1,36	
		A/A	11 (7,6%)	2 (11,8%)	(0,26-7,06)	
	rs11831940	G/G	73 (45,1%)	7 (35%)	1 1,69 (0,63-4,54)	0,45
		A/G	74 (45,7%)	12 (60%)	0,70	
		A/A	15 (9,3%)	1 (5%)	(0,08-6,08)	
	rs13632	G/G	83 (51,9%)	11 (57,9%)	1 0,71 (0,25-2,02)	0,76
		A/G	64 (40%)	6 (31,6%)	1,16	
		A/A	13 (8,1%)	2 (10,5%)	(0,23-5,84)	
HDAC8	rs1475091W	A/A	33 (55%)	5 (71,4%)	1 0,62 (0,13-2,89)	0,63
		A/G	23 (38,3%)	2 (28,6%)	0,51	
		G/G	4 (6,7%)	0	(0,11-2,39)	
	rs1475091M	A/A	75 (74,2%)	9 (81,8%)	1 0,78 (0,35-1,76)	0,55
		G/G	26 (25,4%)	2 (18,2%)		
	rs5912136W	C/G	23 (40,3%)	2 (28,6%)	1 1,69 (0,30-9,47)	0,55
		G/G	34 (59,7%)	5 (71,4%)		
	rs5912136M	G/G	104	11	NA	NA
	rs3012653W	A/A	16 (27,1%)	3 (37,5%)	1	0,66
		A/C	25 (42,4%)	4 (50%)	1,05	

					(0,30-3,64)	
					0,65	
		C/C	18 (30,5%)	1 (12,5%)	(0,22-1,87)	
	rs3012653M	A/A	55 (53,4%)	7 (58,3%)	1	
					0,90	
		C/C	48 (46,6%)	5 (41,7%)	(0,49-1,66)	0,74
HDAC9	rs801524	G/G	107 (65,6%)	12 (60%)	1	
					1,30	
		A/G	48 (29,4%)	7 (35%)	(0,48-3,51)	0,88
					1,11	
		A/A	8 (4,9%)	1 (5%)	(0,13-9,69)	
HDAC10	rs4838866	G/G	118 (73,3%)	14 (73,7%)	1	
					1,08	
		A/G	39 (24,2%)	5 (26,3%)	(0,37-3,19)	0,63
					0,00	
		A/A	4 (2,5%)	0 (0%)	(0,00-NA)	
	rs1555048	G/G	82 (51,2%)	7 (38,9%)	1	
					1,84	
		A/G	70 (43,8%)	11 (61,1%)	(0,68-5,00)	0,2
					0,00	
		A/A	8 (5%)	0 (0%)	(0,00-NA)	
	rs34402301	G/G	136 (86,1%)	16 (88,9%)	1	
					0,81	
		A/G	21 (13,3%)	2 (11,1%)	(0,17-3,78)	0,86
					0,00	
		A/A	1 (0,6%)	0 (0%)	(0,00-NA)	
	rs2341111	G/G	80 (52,3%)	7 (36,8%)	1	
					2,11	
		G/C	65 (42,5%)	12 (63,2%)	(0,79-5,67)	0,12
					0,00	
		C/C	8 (5,2%)	0 (0%)	(0,00-NA)	
HDAC11	rs2655217	G/G	54 (34,4%)	5 (31,2%)	1	
					1,04	
		A/G	73 (46,5%)	7 (43,8%)	(0,31-3,44)	0,86
					1,44	
		A/A	30 (19,1%)	4 (25%)	(0,36-5,77)	
	rs1116048	G/G	103 (64%)	13 (68,4%)	1	
					0,78	
		A/G	51 (31,7%)	5 (26,3%)	(0,26-2,30)	0,88
					1,13	
		A/A	7 (4,3%)	1 (5,3%)	(0,13-9,95)	
	rs2655218	G/G	50 (32,5%)	5 (26,3%)	1	
					1,23	
		A/G	73 (47,4%)	9 (47,4%)	(0,39-3,90)	0,78
					1,61	
		A/A	31 (20,1%)	5 (26,3%)	(0,43-6,03)	

El polimorfismo rs368328 de la HDAC5 muestra asociación significativa con el estadio de cirrosis, tanto en el análisis univariante (Tabla 2 y Figura 1) como cuando se ajusta el análisis por otras variables clínicas (análisis multivariante tabla 3). El análisis de la regresión logística demostró que el genotipo A/A del rs368328 ($p=0,05$) estaba asociado a estadios de cirrosis ($F=4$). El análisis de regresión logística multivariante reflejó la asociación de la variable clínica AST con el riesgo de padecer cirrosis en HCC (Tabla 3). Para determinar el poder predictivo de cada variable independiente y su influencia (Figura 1) realizamos los siguientes modelos de regresión logística obteniendo sus correspondientes AUCROC, especificidad y sensibilidad (Tabla 4). Como se puede observar (Figura 2), el modelo que incluye las dos variables (AST y rs368328 del gen HDAC5) asociados independientemente a cirrosis ($F=4$), es el que muestra un valor predictivo ($AUC=0,770$) con una alta sensibilidad y especificidad (71% y 77% respectivamente).

Tabla 3.- Análisis de regresión logística multivariante de los factores asociados a cirrosis.

Factores clínicos		F≤3	F=4	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
GV1	1	125 (74%)	18 (90%)	1			
	No 1	39 (26%)	2 (10%)	0,35 (0,08-1,60)	0,18	ns	ns
Edad (años)	≤40	59 (36%)	8 (40%)	1			
	>40	105 (64%)	12 (60%)	0,84 (0,33-2,18)	0,72	ns	ns
Carga viral basal (IU/mL)	≤600000	40 (24,3%)	7 (35%)	1			
	>600000	124 (75,7%)	13 (65%)	0,60 (0,22-1,60)	0,3	ns	ns
ALT basal (U/L)	≤40	31 (18,7%)	4 (17,4%)	1			
	>40	134 (81,3%)	19 (82,6%)	4,39 (0,57-34,10)	0,15	ns	ns
AST basal (U/L)	≤40	72 (43,6%)	8 (40%)	1		1	
	>40	93 (56,4%)	12 (60%)	6,96 (1,56-31,00)	0,01	10,75 (1,36-85,26)	0,025
GGT basal (U/L)	≤30	57 (34,9%)	8 (40%)	1			
	>30	106 (65,1%)	12 (60%)	4,84 (1,08-21,60)	0,039	ns	ns
HDAC5 rs368328	A/G-G/G	80 (55,9%)	4 (28,6%)	1		1	
	A/A	63 (44,1%)	10 (71,4%)	3,12 (0,95-11,1)	0,047	3,38 (1,01-11,6)	0,05

5

Tabla 4.- Área bajo la curva de los distintos modelos de regresión logística.

Variables	AUC	IC al 95%	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
AST	0,685	0,565-0,805	93	44
HDAC5	0,637	0,490-0,784	71	56
HDAC5 + AST	0,770	0,643-0,896	71	77

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método *in vitro* de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática caracterizado porque comprende la determinación del genotipo de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749, en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis C crónica.
- 2.- Método según la reivindicación 1, en el que además se determina la concentración de aspartato aminotransferasa (AST) en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis C crónica.
- 3.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el polimorfismo es rs368328.
- 4.- Un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la cirrosis hepática de un sujeto que padece hepatitis C crónica que comprende las siguientes etapas:
 - a. la determinación del genotipo en al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749, en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis C crónica,
 - b. la asociación del genotipo A/A en el polimorfismo genético rs368328, del genotipo G/G en el polimorfismo genético rs454192, del genotipo G/G en el polimorfismo genético rs189050, del genotipo G/G en el polimorfismo genético rs228746, o del genotipo C/C en el polimorfismo genético rs228749, del gen HDAC5 determinado en la etapa (a) a un diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática
- 5.- Método según la reivindicación 4, que además comprende las siguientes etapas:
 - c. la determinación de la concentración de AST en una muestra biológica aislada del mismo sujeto de la etapa (a),
 - d. la asociación de valores de concentración de AST superiores a 40 U/L a un diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática.
- 6.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde en el paso (b) el genotipo que se asocia a un diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática es el genotipo A/A del polimorfismo genético rs368328.
- 7.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 5 y 6, donde la determinación de la concentración de AST se realiza en la misma muestra biológica que la determinación del genotipo del polimorfismo del gen HDAC5.
- 8.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 5 y 6, donde la determinación de la concentración de AST se realiza en una muestra biológica distinta que la determinación del genotipo del polimorfismo del gen HDAC5.
- 9.- Método según la reivindicación 7, donde la muestra biológica es sangre.
- 10.- Método según la reivindicación 8, donde la muestra biológica en la que se determina la concentración de AST es sangre y la muestra biológica en la que se determina el genotipo del polimorfismo del gen HDAC5 se selecciona de la lista que comprende un tejido o un fluido biológico.
- 11.- Método según la reivindicación 10, donde el fluido biológico se selecciona de entre sangre, plasma, suero y linfa.
- 12.- Método según la reivindicación 11, donde el fluido biológico es sangre.
- 13.- Método según la reivindicación 10, donde el tejido es mucosa oral.
- 14.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la determinación del genotipo se realiza mediante sondas de hibridación marcadas con fluoróforos.
- 15.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el sujeto es un humano.
- 16.- Uso de al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749 como marcador pronóstico de cirrosis hepática de un sujeto que padece hepatitis C crónica.
- 17.- Uso según la reivindicación 16, donde el polimorfismo genético del gen HDAC5 es rs368328.

18.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde el polimorfismo se usa en combinación con la determinación de la concentración de AST.

5 19.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde el sujeto es un humano.

20.- Uso de un kit que comprende sondas que permiten determinar el genotipo en al menos un polimorfismo genético del gen HDAC5 seleccionado de la lista que comprende: rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749 para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la cirrosis hepática en un sujeto que padece hepatitis C crónica.

10 21.- Uso según la reivindicación 20, donde el kit comprende sondas que permiten determinar el polimorfismo genético rs368328 del gen HDAC5 para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la cirrosis hepática en un sujeto que padece hepatitis C crónica.

15 22.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, donde el sujeto es un humano.

23.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde el kit además comprende los elementos necesarios para determinar la concentración de AST.

FIG. 1

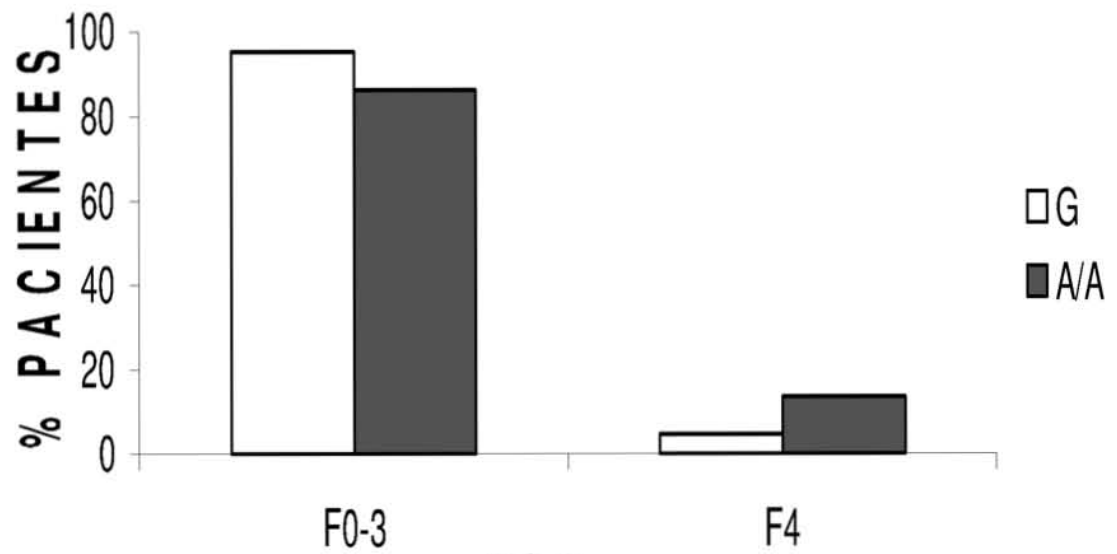
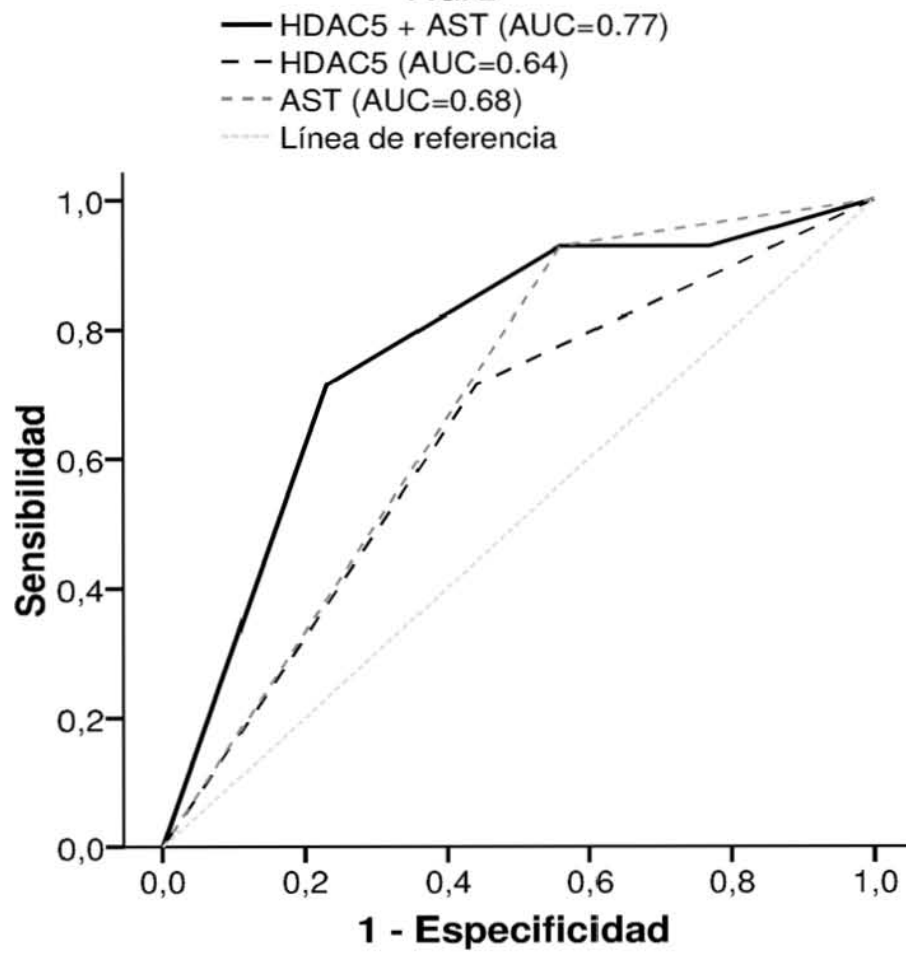


FIG. 2



ES 2 423 154 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid (67%)
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED: ENFERMEDADES
HEPÁTICAS Y DIGESTIVAS (CIBERehd) (33%)

<120> Método in vitro de pronóstico de cirrosis hepática

<130> ES1595.40

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 501

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctcacctggt ttgcggaggg ggaagtcgtc tcgactgtcg tagggcccag gcaaaggcag	60
ttttagtaggag ggaggcgtcc cagggggggcc gctctgggga ggggaactct ggtccaaaga	120
agcatggttg gctcccctgg ggtggggggg ggggtgggat ggaagcagat ctaggttata	180
accagctctg ctggacctgc cacctggcaa tctacattta tgaaaaatcg tttgtatata	240
ggaagaggac rtggatcttg ggggaaggaat gaggaataa accagggatg ggggtcctgt	300
ctctaaggag agattgcagg gcccgatatat gggcacgggg aagaagcccc ttgccatcct	360
atagccaggc agcccctgag cggctcacct atgccacccc atgcctgccc agggccatta	420
ccagcatttg ggggtgctgtg ggaggggaatg gttgaggccg cctgggtgtgg gctcctttga	480
cttcgacaag aggaattcct g	501

<210> 2

<211> 501

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agcctcccaa actaacctga gattacaggt gtgagccacc gtgctcagcc tgtattttcc	60
tattgaagtt catggcttca gcctcattta attaaaggtaa aatgttgcat ccatggagca	120
gagggatttg acttcctctc tgtctctgtt ctctttgggt ctccatagaat cctgcgtggg	180
agcctttggg cctcaggcat gactggagtc tggggctggg cccactaact ccttcctgtc	240
tcttctgccc rcagtggagg tgaagccggg gctgccaaaga gccatgccc gttccatggg	300
gggtgggggt ggaggcagcc ccagccctgt ggagctacgg ggggctctgg tgggctctgt	360
ggacccaca ctgcgggagc agcaactgca gcaggagctc ctggcgctca agcagcagca	420
gcagctgcag aagcagctcc tgttcgctga gttccagaaa cagcatgacc acctgacaag	480
gcagcatgag gtccagctgc a	501

<210> 3

<211> 760

<212> DNA

ES 2 423 154 A1

<213> Homo sapiens

<400> 3

ccaaaaaaaa	aaaagaccaa	aaaacccaaa	actgtttttg	ttttttttcc	cctctctccc	60
ttttaatgct	ggggggtgtc	tgaagaaagc	cagctcatga	agccagaaga	tatggtagcc	120
agaagatttc	ggggtccttt	ttctcaggcc	tgggctggag	tgggccactt	tgccacagga	180
gtcttcccag	ccccttgtga	cctcctgggg	ctgtagcgag	gagagtgagg	gctttttttg	240
gagaaagaag	tagaagagaa	acaggaatgg	gttggcctgc	ctctctcact	tccgccttcc	300
caggcagtgg	tatcctgcct	tcccccttcc	ggctggagac	tttgtggggc	ttgggctggg	360
cttggggctc	cctgctgggt	tgggtgtttg	ccagttgtcc	tggcaaccac	agggcagtgg	420
tgaggagtga	catgcagtga	cctgagaact	gtgtgtaggt	acaaagaagt	ggagacctag	480
ccctcccata	agcccattgg	aacttcgtgc	actccctgag	ccactcggcc	cattgtccat	540
gtggggactg	gacccaaggt	cttggaaccc	agcaggccct	ccactgcctt	cccctccsca	600
gcagccttcc	tctccccagc	cggttctccg	taagaccaga	gttctgagat	ctctgccgaa	660
gctcctgccc	tccccctgct	gttacccttc	ttcctgtctg	attccctttc	ctttcctgtc	720
tcctcctccc	acctcctccc	tgctgcctgc	ccgcccattc			760

<210> 4

<211> 1061

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

accctgcctg	caggggggttc	cagaggccat	actccaggca	tgcgggtggc	atggccttgg	60
cctcggcctc	cagcaggcct	tgctcctgcc	ttggtgacac	ccattcagtg	ctaggttctc	120
tggagagatc	cagacccatc	taaacaggtg	tgggggcctc	tcttagccca	ccctttgcca	180
cctcctacct	cccacctccc	tctcttctct	ttaaaaattg	tttggctggg	tgtggtcact	240
catgcctgta	atcccagcac	tttgggaggc	cgaggcgggt	ggatcacctg	aggtcaggag	300
ttcgagacca	gcctgaccta	catggtgaaa	ccccgtttct	actaaaaata	caaaaattag	360
ctaggcctgg	tgggtgggcgc	ctgtaatccc	agctgcttgg	gaggctgagg	caggagaatt	420
gcttgaaccc	aggaggcgga	ggttgcagtg	agactccatc	taaaaaaaaag	gccaggggca	480
gtggctcatg	cctgtaatcc	cagccctttg	ggaggccgag	gcgagcggat	cacctgaggt	540
caagagtttg	agaccagcct	ggccaacatg	gtgaaacctt	gtgtctacta	aaaatacaaa	600
aaaattagct	gagcgtgggt	gcgggtgcct	gtaatcccag	ctacttgccg	ggctgaggca	660
ggaaaactgc	ttgaaccag	gaggcagagg	ttgcagtgag	ccgagattgt	gccactgcac	720
tccagcctgg	atgacaagag	caaaactcca	tctccaaaaa	aaaaaaaaaac	aaaaaaaaaac	780
caaaacttgt	tttttgtttt	ttttttccct	ctctcgccct	ttaatgctgg	cgggtgggtct	840
ggagagaggc	cagctcatga	rggcagaaga	tactggtagc	cagaaggatt	tcggggctct	900
tttttctcag	gcctgggctg	gagtgggcca	ctttgccaca	ggagtcttcc	cagcccctcg	960
tgacctccct	gggctgtagc	gaggagagtg	agggctttct	ttggagaaag	aagtagaaga	1020
gaaacaggaa	tgggttggcc	tgctctctct	acttccgcct	t		1061

<210> 5

<211> 1084

ES 2 423 154 A1

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tctggccact tctgcacatg tggctctggc cttgtggcca cagagtcgtc agtatggctg	60
gcgggaaaac cacagaggaa tgttcccaac catgcctggg ggagaagagg ctgggtggga	120
ctgctacatc atgctgagct tttaccttct cccacccac cctgcctgca gggggttcca	180
gaggccatac tccaggcatg ygggtggcat ggccttggcc tcggcctcca gcaggccttg	240
ctcctgcctt ggtgacaccc attcagtgtc aggttctctg gagagatcca gacccatcta	300
aacaggtgtg ggggcctctc ttagccacc ctttggcacc tcctacctcc cacctccctc	360
tcttctcttt aaaaattggt tggctgggtg tggtcactca tgctgtaat ccagcactt	420
tgggaggccg aggcgggtgg atcacctgag gtcaggagtt cgagaccagc ctgacctaca	480
tggtgaaacc ccgtttctac taaaaatata aaaattagct aggcctggtg gtgggcgcct	540
gtaatcccag ctgcttggga ggctgaggca ggagaattgc ttgaaccagc gaggcggagg	600
ttgcagtgtg actccatcta aaaaaaaggc caggggcagt ggctcatgcc tghaatccca	660
gccctttggg aggcggaggc gagcggatca cctgagggtc agagtttgag accagcctgg	720
ccaacatggt gaaaccttgt gtctactaaa aatacaaaaa aattagctga gcgtgggtggc	780
gggtgcctgt aatcccagct acttgccggg ctgaggcagg aaaactgctt gaaccagga	840
ggcagagggt gcagtgtgag gagattgtgc cactgcactc cagcctggat gacaagagca	900
aaactccatc tccaaaaaaa aaaaaaacia aaaaaaacca aaacttggtt tttgtttttt	960
ttttccctct ctgcctctt aatgctggcg ggtggtctgg agagaggcca gctcatgagg	1020
gcagaagata ctggtagcca gaaggatttc ggggtccttt tttctcaggc ctgggctgga	1080
gtgg	1084

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

acttcgtcag taacggacgc tcattccttc cccaagatcc at	42
--	----

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gagtcgaggt catatcgtgc tcattccttc cccaagatcc ac	42
--	----

<210> 8

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ctctttctat atacaaacga ttttagagtca acgatttgcc cggacgtctg cctatagtga	60
gtc	63



- ②① N.º solicitud: 201230365
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007053502 A2 (NOVARTIS AG) 10.05.2007, todo el documento.	1-23
A	US 2011129831 A1 (CARGILL MICHELE et al.) 02.06.2011, todo el documento.	1-23
A	LOPEZ-RODRIGUEZ, R. et al., 'Genetic variants of interferon-stimulated genes and IL-28B as host prognostic factors of response to combination treatment for chronic hepatitis C', CLIN. PHARMACOL. THER., 2011 Nov, Vol. 90, No. 5, páginas 712-721, ISSN: 0009-9236(print), ISSN: 1532-6535(electronic), todo el documento.	1-23
A	OCHI, H. et al., 'IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy--fine-mapping and replication study in Asian populations', J. GEN. VIROL., 2011 May, Vol. 92, No. Pt 5, páginas 1071-1081, ISSN: 1465-2099 (Electronic), todo el documento.	1-23

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
16.07.2013

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

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, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.07.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-23	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 2007053502 A2 (NOVARTIS AG)	10.05.2007
D02	US 2011129831 A1 (CARGILL MICHELE et al.)	02.06.2011
D03	LOPEZ-RODRIGUEZ, R. et al., <i>Clin. Pharmacol. Ther.</i> , (2011 Nov), <u>0</u> (5):712-21.	2011 Nov
D04	OCHI, H. et al., <i>J. Gen. Virol.</i> , (2011 May), <u>92</u> (Pt 5):1071-81.	2011 May

En D1 se describen mutaciones y polimorfismos que afectan al gen HDAC5.

En D2 se divulgan polimorfismos genéticos asociados a la fibrosis hepática.

En D3-D4 se describen métodos de predicción de la respuesta al tratamiento terapéutico de la hepatitis C crónica.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de cirrosis hepática que comprende básicamente la determinación del genotipo de al menos un polimorfismo genético del gen *HDAC5* seleccionado de entre rs368328, rs454192, rs189050, rs228746 y rs228749 en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece hepatitis C crónica. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D4, no se ha divulgado ningún método que comparta las mismas características técnicas del procedimiento reivindicado en la solicitud de patente. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia combinando la información descrita previamente en este campo de la técnica.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-23 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.