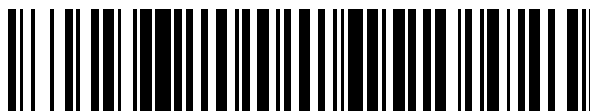


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 290**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2011 E 11717518 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2558592**

54 Título: **Polimorfismos de un solo nucleótido que predicen los resultados del tratamiento del VHC**

30 Prioridad:

13.04.2010 US 323502 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.12.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CHU, TOM;
ESSIOUX, LAURENT;
GERMER, SOREN;
LOPATIN, URI;
SHULMAN, NANCY y
THOMMES, JAMES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 525 290 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polimorfismos de un solo nucleótido que predicen los resultados del tratamiento del VHC

- 5 La presente invención se refiere a métodos que resultan útiles para predecir la respuesta de los pacientes infectados por virus de la hepatitis C (VHC) al tratamiento farmacológico.

Antecedentes de la invención

- 10 El estándar de cuidado para la hepatitis C crónica es la combinación de peginterferón más ribavirina¹. Las tasas globales de respuesta virológica sostenida (RVS) tras el tratamiento con el estándar de cuidado son de aproximadamente 50%²⁻⁴, aunque resulta difícil predecir si un paciente individual presentará una RVS.

- 15 La probabilidad de conseguir una RVS varía según el paciente y algunos factores víricos. Por ejemplo, los pacientes jóvenes, los pacientes caucásicos y asiáticos, y los individuos con fibrosis hepática avanzada es más probable que eliminen la infección por VHC tras el tratamiento⁵⁻⁸. De manera similar, los pacientes infectados por VHC genotipos 2 ó 3, pero no genotipo 1, y aquellos con niveles de ARN del VHC de línea base en el suero presentan la mejor probabilidad de curación^{2,4,6,8}.

- 20 Actualmente resulta posible una predicción más precisa de la RVS sólo tras el inicio del tratamiento. Con independencia del genotipo del VHC, los individuos que eliminan el ARN del VHC tras 4 ó 12 semanas de tratamiento presentan una probabilidad mucho mayor de alcanzar una RVS que aquellos que presentan viremia persistente⁹. La respuesta virológica rápida (RVR, ARN del VHC indetectable en la semana 4) es un factor predictivo fuerte de RVS; a la inversa, la no consecución de una respuesta virológica temprana (RVT, una caída superior a dos log del ARN del VHC en la semana 12) es un factor predictivo fuerte de no respuesta, con independencia de las características previas al tratamiento¹⁰.

- 25 La capacidad de diferenciar prospectivamente entre respondedores potenciales y no respondedores al estándar de cuidado podría presentar un gran impacto sobre el cuidado de los pacientes con hepatitis C crónica. Las decisiones de tratamiento podrían personalizarse basándose en la probabilidad de los pacientes de respuesta al estándar de cuidado. Por ejemplo, los pacientes con la probabilidad más baja de producir una RVS con el estándar de cuidado actual podrían retrasar el tratamiento hasta disponer de agentes antivíricos de acción directa. A la inversa, los pacientes con una probabilidad elevada de producir una RVS podrían preferir el inicio inmediato de la terapia con un régimen de tratamiento que sea una entidad conocida.

- 30 Además de factores del huésped y víricos, la diversidad genética del huésped también influye sobre la respuesta al tratamiento con el estándar de cuidado¹¹. Los últimos datos de estudios de asociación genómica sugieren que los polimorfismos de un solo nucleótido (PSN) en la región promotora del gen IL-28b ejercen una fuerte influencia sobre la probabilidad de RVS en pacientes tratados con peginterferón más ribavirina¹²⁻¹⁴. Los objetivos del presente análisis eran explorar los PSN asociados tanto a una respuesta virológica temprana (RVT) y la RVS en una cohorte diversa de pacientes que incluía individuos nunca tratados y no respondedores a un curso previo de peginterferón alfa-2b (12KD) más ribavirina que recibieron monoterapia de peginterferón alfa-2a (40KD) o terapia de combinación con peginterferón alfa-2a (40KD) o interferón convencional más ribavirina.

- 35 Referencia: Rauch Andri et al., "Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study", Gastroenterology, ELSEVIER; PHILADELPHIA, PA, vol. 138, no. 4, 1 de abril de 2010 (2010-04-01), páginas 1338 a 1345 informa de un estudio de asociación genómica para el cribado de una respuesta sostenida a terapia de interferón alfa pegilado y ribavirina. El estudio identificó, por ejemplo, la influencia del PSN rs8099917 sobre el control natural e inducido por tratamiento de la infección por el VHC.

40 Descripción resumida de la invención

- 45 La presente invención se basa en el descubrimiento de una asociación entre el PSN rs10009948 sobre el cromosoma humano cuatro y la RVS en pacientes tratados con regímenes basados en interferón. En una realización, la invención proporciona un método para predecir una respuesta virológica sostenida de un sujeto humano infectado por el VHC al tratamiento de interferón, que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto humano, detectar la presencia del polimorfismo de un solo nucleótido dentro del cromosoma 4 y determinar que dicho sujeto presenta una elevada probabilidad de respuesta virológica sostenida al tratamiento de interferón en el caso de que se encuentre presente dicho polimorfismo de un solo nucleótido, en el que el polimorfismo de un solo nucleótido es una G en rs10009948.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Resultados de asociación genómica para (a) RVS, (b) RVT y (c) RVS tras el ajuste para rs12979860 según cromosoma en la población global de genotipo 1.

Figura 2. Gráfico cuantil-cuantil de la distribución de estadísticos de ensayo para (a) RVS y (b) RVT. Los círculos grises indican los valores de p esperados y los círculos azules muestran los valores de p observados.

Figura 3. Desequilibrio de ligamiento de PSN significativos ($p < 10^{-5}$) en la región de *IL-28* de la población caucásica de genotipo 1.

Descripción detallada de la invenciónDefiniciones

Con el fin de facilitar la comprensión de la invención, se definen varios términos a continuación. Los términos definidos en la presente memoria presentan los significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia en las áreas relevantes a la presente invención. Algunos términos tales como "un", "una" y "el" y "la" no pretenden referirse a únicamente una entidad singular, sino que incluyen la clase general del que puede utilizarse un ejemplo específico como ilustración. La terminología en la presente memoria se utiliza para describir realizaciones específicas de la invención, aunque su uso no delimita la invención, excepto tal como se indica de manera general en las reivindicaciones.

El término "respuesta" al tratamiento con interferón es una respuesta deseable a la administración de un agente. Los puntos finales virológicos incluyen "respuesta virológica temprana" (RVT), definida como una caída ≥ 2 -log del ARN del VHC sérico respecto a la línea base hasta la semana 12 (según el ensayo Cobas Amplicor HCV Monitor, v2.0, límite de cuantificación: 600 IU/ml), definida la RVT (RVTc) como ARN del VHC indetectable en el suero (según el ensayo Cobas Amplicor HCV v2.0, límite de detección: 50 IU/ml) y "respuesta virológica sostenida" (RVS), definida como ARN del VHC no detectable (< 50 IU/ml) al final de un periodo de seguimiento sin tratamiento de 24 semanas.

Las expresiones "muestra" o "muestra biológica" se refieren a una muestra de tejido o líquido aislado de un individuo, que incluye, aunque sin limitarse a ellos, por ejemplo, biopsia de tejido, plasma, suero, sangre completa, líquido espinal, líquido linfático, las secciones externas de la piel, tractos respiratorios, intestinales y genitourinarios, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores y órganos. También se encuentran incluidas muestras de constituyentes de cultivo celular in vitro (incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, medio condicionado resultante del crecimiento de células en medio de cultivo, células putativamente infectadas por virus, células recombinantes y componentes celulares).

Las expresiones "interferón" e "interferón-alfa" se utilizan intercambiamente en la presente memoria y se refieren a la familia de proteínas específicas de especie altamente homólogas que inhiben la replicación vírica y la proliferación celular y modulan la respuesta inmunológica. Entre los interferones adecuados típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, interferón recombinante alfa-2b, tal como interferón Intron[®] A disponible de Schering Corporation, Kenilworth, N.J., interferón alfa-2a recombinante, tal como interferón Roferon[®]-A, disponible de Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J., interferón alfa-2C recombinante, tal como interferón Berofor[®] alfa 2, disponible de Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn., interferón alfa-n1, una mezcla purificada de alfa-interferones naturales, tales como Sumiferon[®], disponibles de Sumitomo, Japón, o como interferón alfa-n1 Wellferon[®] (INS), disponible de Glaxo-Wellcome Ltd., London, Reino Unido, o un alfa-interferón de consenso, tal como los indicados en las patentes US n° 4.897.471 y n° 4.695.623 (especialmente los Ejemplos 7, 8 ó 9 de las mismas) y el producto específico disponible de Amgen, Inc., Newbury Park, Calif., o interferón alfa-n3, una mezcla de alfa-interferones natural preparada por Interferon Sciences y disponible de the Purdue Frederick Co., Norwalk, Conn., bajo el nombre comercial Alferon. Resulta preferente la utilización de interferón alfa-2a o alfa-2b. Entre los interferones pueden incluirse los interferones pegilados definidos posteriormente.

Las expresiones "interferón pegilado", "interferón-alfa pegilado" y "peginterferón" se utilizan intercambiamente en la presente memoria y se refieren a conjugados modificados con polietilenglicol de interferón alfa, preferentemente interferón alfa-2a y alfa-2b. Entre los interferones alfa pegilados adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Pegasys[®] y Peg-Intron[®].

El término "ribavirina" se refiere al compuesto amida de ácido 1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico, que es un análogo de nucleósido antivírico sintético, no inductor de interferón, de amplio espectro y disponible bajo los nombres Virazole[®] y Copegus[®].

Los "agentes antiviricos de acción directa" ejercen efectos antiviricos específicos independientes de la función inmunológica. Entre los ejemplos de agentes antiviricos de acción directa para el VHC se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los inhibidores de proteasa, los inhibidores de polimerasa, los inhibidores de NS5A, los inhibidores de IRES y los inhibidores de helicasa.

5 El tratamiento de primera línea recomendado actualmente para pacientes con hepatitis C crónica es el interferón alfa pegilado en combinación con ribavirina durante 48 semanas en pacientes que portan virus de genotipo 1 ó 4 y durante 24 semanas en los pacientes que portan virus de genotipo 2 ó 3. El tratamiento combinado con ribavirina se encontró que resultaba más eficaz que la monoterapia con interferón alfa en pacientes con recaída tras uno o más cursos de terapia de interferón alfa, así como en pacientes previamente no tratados. Sin embargo, la ribavirina ejerce efectos secundarios significativos, incluyendo teratogenicidad y carcinogenicidad. Además, la ribavirina causa anemia hemolítica que requiere reducción de la dosis o interrupción de la terapia de ribavirina en aproximadamente 10% a 20% de los pacientes, que puede relacionarse con la acumulación de la ribavirina trifosfato en los eritrocitos. Por lo tanto, para reducir el coste del tratamiento y la incidencia de sucesos adversos, resulta deseable ajustar el tratamiento a una duración más corta sin comprometer la eficacia. Una "duración de tratamiento" acortada para los pacientes de genotipo 1 con interferón alfa pegilado con ribavirina podría ser, por ejemplo de 24 semanas. Una duración acortada del tratamiento para los pacientes de genotipo 1 con interferón alfa pegilado con ribavirina en combinación con un agente antivirico de acción directa podría ser de tan sólo 8 semanas, 12 semanas ó 16 semanas.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "alelo" y "variante alélica" se refieren a formas alternativas de un gen, incluyendo intrones, exones, uniones de intrón/exón y regiones 3' y/o 5' no traducidas que se encuentran asociadas a un gen o partes del mismo. Generalmente los alelos ocupan el mismo locus o posición en cromosomas homólogos. En el caso de que un sujeto presente dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigótico para el gen o alelo. En el caso de que un sujeto presente dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigótico para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir entre sí en un único nucleótido, o en varios nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polimorfismo" se refiere a la coexistencia de más de una forma de ácido nucleico, incluyendo exones e intrones, o una parte (por ejemplo una variante alélica) de los mismos. Una parte de un gen del que existen por lo menos dos formas diferentes, es decir, dos secuencias de nucleótidos diferentes, se denomina región polimórfica del gen. Una región polimórfica puede ser un único nucleótido, es decir, un "polimorfismo de un solo nucleótido", o "PSN", la identidad del cual difiere en diferentes alelos. Una región polimórfica también puede presentar una longitud de varios nucleótidos.

30 Se conocen numerosos métodos para la detección de polimorfismos y pueden utilizarse conjuntamente con la presente invención. Generalmente incluyen la identificación de una o más mutaciones en la secuencia de ácidos nucleicos subyacente, directamente (por ejemplo hibridación in situ) o indirectamente (identificación de cambios en una molécula secundaria, por ejemplo secuencia de proteína o unión de proteína).

35 Un método bien conocido para detectar polimorfismos es la hibridación específica de alelo utilizando sondas que solapan la mutación o sitio polimórfico y que presentan aproximadamente 5, 10, 20, 25 ó 30 nucleótidos circundando la mutación o región polimórfica. Para la utilización en un kit se proporcionan, por ejemplo, varias sondas capaces de hibridarse específicamente con variantes alélicas, tales como polimorfismos de un solo nucleótido, para el usuario, o incluso se unen a un soporte de fase sólida, por ejemplo una perla o chip.

40 El polimorfismo de un solo nucleótido "rs12979860" se refiere a un PSN identificado por su número de acceso en la base de datos de PSN (bdPNS, www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) y se localiza en el cromosoma humano 19 en la región promotora del gen *IL28b*.

45 Los resultados de este análisis de los datos de dos estudios multinacionales de gran tamaño (descritos en la sección de Ejemplos) confirman y extienden la notable asociación entre los PSN en la región IL-28 y RVS tras el tratamiento con peginterferón más ribavirina informada en primer lugar en Ge et al.¹². En el presente análisis, el PSN superior (rs1297980) se encontraba asociado tanto a RVT ($p=5,0 \times 10^{-26}$) y RVS ($p=1,4 \times 10^{-21}$). La inclusión de los pacientes que consiguieron una RVS tras el tratamiento no sólo con peginterferón alfa-2a (40KD) más ribavirina, sino también bajo monoterapia con peginterferón alfa-2a (40KD) y la combinación convencional de interferón más ribavirina, así como la buena selección del gran subgrupo de no respondedores son fortalezas únicas de este estudio.

50 El presente estudio permite generar varias sugerencias únicas. En primer lugar, los presentes inventores sugieren que el efecto de rs12979860 se ejerce más probablemente sobre la RVT que sobre la RVS. Se observó una asociación con RVT, pero no con RVS, en no respondedores anteriores a la terapia y en pacientes tratados mediante monoterapia con peginterferón alfa-2a (40KD) o interferón más ribavirina convencional. Los presentes inventores interpretan lo anterior en el sentido de que el mecanismo por el que actúa este PSN se asocia a la rápida

caída en una primera fase de los niveles séricos de ARN del VHC y no con la caída más lenta en una segunda fase o la renovación de los hepatocitos. La caída en la primera fase del ARN del VHC es un fenómeno bien descrito que se produce poco después del inicio de la terapia basada en interferón y se ha sugerido que es un indicador de la sensibilidad de un paciente particular al interferón¹⁹.

A continuación, el chip particular utilizado en el presente estudio permitió clasificar la significancia de una serie de PSN además de rs12979860, la totalidad de los cuales habían sido identificados en estudios anteriores^{12-14,20,21}. Aunque se identificaron varios marcadores altamente significativos en la región *IL28b*, ninguno de ellos se encontraba significativamente asociado a la RVS tras el ajuste para rs1297980. Sólo un PSN (rs8099917) se encontraba asociado de manera estadísticamente significativa con la RVT tras el ajuste para rs12979860; sin embargo, la asociación era tal que no se consideraría significativa tras el ajuste para comparaciones múltiples.

Además, mediante el ajuste para rs12979860, los presentes inventores pudieron empezar a explorar las potenciales interacciones entre genes que podrían afectar a la probabilidad de producir una respuesta virológica. Tal como se ha indicado anteriormente, no se retuvo ninguno de los demás PSN altamente significativos en la región *IL28b* identificados en el análisis primario después de dicho procedimiento; sin embargo, se descubrió una serie de PSN previamente no identificados, situados en el cromosoma 4.

Unos resultados consistentes obtenidos en varios estudios retrospectivos^{12-14,20-23}, incluyendo el presente, permiten afirmar con confianza a los presentes inventores que los PSN en la región promotora de *IL28b* se encuentran altamente asociados al resultado del tratamiento con terapia basada en interferón. Se ha sugerido que los cambios en uno de los múltiples promotores en esta región alteran la expresión hepática del interferón lambda. El interferón lambda es un interferón de tipo III que induce una ruta de señalización que se solapa con la ruta Jak/Stat de interferones de tipo I (incluyendo interferón alfa)²⁴⁻²⁶. Los presentes inventores han planteado la hipótesis de que en pacientes con un PSN "permisivo", la infección por el VHC induce la producción local de interferones, incluyendo los interferones de tipo III (tal como IL28). Lo anterior resulta en la expresión génica inducida por interferón en el hígado. Dicha hipótesis es consistente con informes anteriores de que los no respondedores a la terapia basada en interferón han incrementado la expresión hepática de los genes estimulados por interferón (GEI) en el hígado antes del inicio de la terapia y se encuentran en un aparente estado "preactivado". Esta aparentemente paradójica relación entre el nivel de inducción de GEI endógeno y la posterior sensibilidad a la terapia basada en interferón no ha sido explicada con claridad. Algunos investigadores han conjeturado que algunos de los efectos posteriores de la inducción de GEI en un eje similar a la proteína quinasa PKR podrían suprimir la producción endógena de proteínas mediante la fosforilación del factor 2 alfa eucariótico de inicio (IF2a_e) y resultar en hepatocitos que, al ser refractarios a la estimulación adicional por interferón exógeno, son incapaces de atenuar adicionalmente la producción de proteínas²⁸. El ARN del VHC se traduce mediante un sitio interno de entrada ribosómica y es parcialmente independiente de IF2a_e. De esta manera, la replicación del ARN del VHC y el ensamblaje de viriones adicionales puede continuar constantemente a pesar del estado "pre-activado"²⁸. Esta hipótesis explica por qué un genotipo GWAS de baja sensibilidad se asocia a una carga vírica más baja que el genotipo más tratable en el análisis de los presentes inventores, a pesar de los análisis anteriores que sugieren que una carga vírica de línea base creciente es un indicador de resultados de tratamiento pobres⁶. La producción endógena de interferón perjudica parcialmente la replicación vírica, pero simultáneamente altera la síntesis de proteínas de la célula huésped en estos pacientes. Podría existir un umbral por encima del cual las células huésped no pueden reducir adicionalmente la producción de proteínas o incrementar la estimulación de GEI. De esta manera, el interferón exógeno no puede incrementar la respuesta del huésped. Paradójicamente, la administración de interferón pegilado exógeno puede, sin embargo, "rescatar" pacientes que son menos sensibles al interferón endógeno. El polimorfismo genético podría desempeñar un papel en la expresión de GEI. Ello lleva a los presentes inventores a conjeturar que finalmente podría resultar posible un tratamiento selectivo de la ruta del interferón para producir un perfil de GEI más favorable que resulte en la erradicación del VHC.

Resulta todavía más difícil explicar el posible mecanismo por el que un PSN en el cromosoma 4 se asocia a la RVS, aunque no con la RVT. La explicación más sencilla podría requerir la participación de un gen de esta región en un fenómeno que se asocia exclusivamente a la RVS, tal como la renovación de los hepatocitos. Podría participar interacciones génicas adicionales huésped-huésped o huésped-virus en el mecanismo por el que ambos loci ejercen sus efectos, y requieren una evaluación cuidadosa adicional.

El descubrimiento de un locus de susceptibilidad al tratamiento de interferón en la región *IL28b* presenta implicaciones para la terapia con el estándar de cuidado (EDC) actual, es decir, peginterferón más ribavirina. En el futuro próximo, podría contemplarse que en algunos pacientes el genotipo *IL28b* se determine antes de iniciar la terapia y que los pacientes se clasifiquen no sólo según el genotipo del VHC, tal como se recomienda actualmente¹, sino también según el genotipo humano. En contraste con el paradigma de tratamiento actual, el régimen de tratamiento inicial se basa tanto en el genotipo vírico como en el genotipo humano. El papel putativo de la ribavirina en el presente contexto deberá investigarse en futuros ensayos prospectivos.

Este descubrimiento también presenta implicaciones para los programas de desarrollo actualmente en marcha de agentes antivíricos de acción directa para la terapia del VHC. Los agentes antivíricos de acción directa ejercen efectos antivíricos específicos que son independientes de la función inmunológica, pero se cree que por lo menos algunas de las clases farmacológicas en desarrollo podría beneficiarse de un efecto inmunomodulador innato aditivo (si no sinérgico). En efecto es probable que la terapia basada en interferón siga siendo el esqueleto del tratamiento debido a que resulta necesaria para evitar la emergencia de VHC resistentes²⁹. El ARN del VHC codifica proteínas específicas que podrían inhibir la inducción de interferones de tipo I. Por ejemplo, la proteasa NS3-4A del VHC bloquea la producción de interferón inducida por ARNdc mediante la interferencia con la fosforilación del factor-3 regulador del interferón (FRI-3)³⁰. De esta manera, la proteasa NS3-4A es una diana terapéutica doble, cuya inhibición puede bloquear la replicación vírica y restaurar el control de FRI-3 de la replicación del ARN del VHC. Algunos inhibidores de proteasa, tales como el telaprevir, que presentan robustos efectos antivíricos en el caso de que se administren en combinación con una segunda molécula pequeña o el estándar de cuidado, también inhiben las funciones de proteasa por las que el VHC altera la respuesta de interferón del huésped. Es importante observar si los resultados de tratamiento son similares al combinar agentes antivíricos de acción directa con peginterferón más ribavirina en pacientes con fenotipos de IL28b refractarios al interferón y sensibles al interferón. Posiblemente los pacientes refractarios al interferón responderán a la triple terapia (agente antivírico de acción directa más peginterferón más ribavirina) tal como si estuvieron bajo monoterapia con el agente antivírico de acción directa únicamente. Si éste es el caso, los pacientes con el fenotipo de IL28b refractario al interferón podrían ser mucho más susceptibles a la selección de mutaciones de resistencia durante el tratamiento con un fármaco tal como telaprevir³¹. Estas posibilidades sugieren escenarios en los que los pacientes con el PSN susceptible al interferón (rs12979860) podrían beneficiarse del tratamiento abreviado con peginterferón y ribavirina, y aquellos con un genotipo refractario al interferón podrían ser candidatos a duraciones de tratamiento extendidas y/o a regímenes de tratamiento más intensivos. Alternativamente, los regímenes de combinación sin interferón de agentes antivíricos de acción directa podrían resultar más apropiados para pacientes con un genotipo refractario al interferón.

La base de datos única de los presentes inventores, que incluye una prueba de registro de terapia de peginterferón alfa-2a más ribavirina para los pacientes que previamente habían sido no respondedores al estándar de cuidado con un interferón pegilado, subraya la correlación del PSN rs12979860 con la RVT y no con la RVS. En otras palabras, este PSN define la sensibilidad del paciente al interferón y no la respuesta final a la terapia y, de esta manera, ayuda a identificar los pacientes que con una u otra probabilidad producirán una RVS debido a su probabilidad de producir una RVT. Es improbable que predigan una RVS independientemente de una RVT. Lo anterior presenta tremendas implicaciones para la utilización de agentes antivíricos de acción directa conjuntamente con interferón.

La utilización de factores predictivos genéticos de línea base para la sensibilidad del interferón permite personalizar las terapias antivíricas de acción directa, así como el estándar de cuidado con interferón. Los pacientes definidos como de baja sensibilidad al interferón, es decir, dos alelos T en rs12979860, podrían ser candidatos pobres a terapéuticos de molécula pequeña que se basan en los efectos aditivos o sinérgicos de rutas medidas por interferón endógeno o exógeno, en particular en el caso de que estos se proporcionen en forma de agente único conjuntamente con EDC. El problema podría ser que estos pacientes presentasen un riesgo incrementado de desarrollar mutaciones de resistencia farmacológica como resultado de una monoterapia eficaz.

A la inversa, los pacientes con un fenotipo sensible al interferón, es decir, dos alelos C en rs12979860, serían candidatos superiores a cursos más cortos de terapia con únicamente EDC, o en combinación con moléculas pequeñas. La predisposición genética de sensibilidad al interferón permite la "personalización" de la combinación con agentes antivíricos de acción directa. Los pacientes en los que se predice una sensibilidad aceptable al interferón endógeno podrían ser candidatos excelentes a fármacos que presentan su diana en funciones víricas, tales como los inhibidores de proteasa, los cuales también presentan una función como inhibidores de la respuesta al interferón endógeno, y peores candidatos para fármacos que reducen las cantidades de PAMP vírico (patrón molecular asociado a patógeno, por ejemplo inhibidores de polimerasa), ya que estos podrían servir para alterar la capacidad del paciente de facilitar su propia curación mediante la sensibilidad al interferón endógeno. De manera similar, los pacientes en los que se predice que presentan una baja sensibilidad al interferón podrían ser candidatos para la terapia "quad" como primera línea de terapia (2 agentes antivíricos de acción directa, añadidos a peginterferón más ribavirina), en comparación con un agente antivírico de acción directa únicamente, o triple terapia (EDC más un AAD).

Ejemplos

Métodos

Recolección de muestras del paciente y criterios de valoración virológicos

Se analizaron muestras de un subgrupo de pacientes con hepatitis C crónica incluidos en dos ensayos de fase III multinacionales aleatorizados de gran tamaño^{3,15}. En un estudio, se asignaron aleatoriamente pacientes no

5 expuestos a interferón, a 48 semanas de tratamiento con peginterferón alfa-2a (40KD) solo o en combinación con ribavirina, o a interferón alfa-2b convencional más ribavirina³. Sólo los no respondedores a un curso previo de 12 semanas de peginterferón alfa-2b (12KD) más ribavirina eran elegibles para el segundo ensayo, en el que se asignaron aleatoriamente los pacientes a 48 ó 72 semanas de tratamiento con un régimen de dosificación estándar o de inducción de peginterferón alfa-2a (40KD) (todos los pacientes recibieron una dosis estándar de ribavirina)¹⁵. El diseño del estudio, los criterios de inclusión y exclusión y los resultados principales de estos ensayos han sido publicados en otros sitios^{3,15}.

10 Se almacenaron en el repositorio de muestras clínicas de Roche muestras de sangre de pacientes que habían consentido en participar en análisis genéticos. Se extrajo el ADN en el repositorio de muestras clínicas de Roche y se normalizó a 50 ng/ml. Las muestras inicialmente se sometieron a una comprobación de calidad utilizando un ensayo TaqMan específico del cromosoma Y (Applied Biosystems, Foster City, CA) con el fin de evaluar tanto la calidad del ADN como la concordancia de género con los datos clínicos.

15 Los puntos finales virológicos incluían la "respuesta virológica temprana" (RVT), definida como ARN del VHC indetectable en suero (según el ensayo Cobas Amplicor HCV Monitor, v2.0, límite de cuantificación: 50 IU/ml), o una caída ≥ 2 -log en el nivel sérico de ARN del VHC entre la línea base y la semana 12 (según el ensayo Cobas Amplicor HCV v2.0, límite de detección: 600 IU/ml) y una "respuesta virológica sostenida" (RVS), definida como ARN del VHC no detectable (< 50 IU/ml) al final de un período de seguimiento sin tratamiento de 24 semanas.

20 En el análisis de GWAS para la RVS, el grupo respondedor estaba compuesto de todos los pacientes de genotipo 1 con RVS de la población de estudio nunca expuestos a interferón. El grupo de no respondedores estaba compuesto de: 1) todos los pacientes de genotipo 1 sin RVS de la población de estudio retados nuevamente con tratamiento de interferón pegilado, 2) los pacientes de genotipo 1 no RVS de la población de estudio nunca expuestos a interferón tratados con interferón pegilado con ribavirina.

25 Por lo tanto, se excluyeron del análisis de los presentes inventores todos los respondedores de la población de estudio retados nuevamente con interferón pegilado.

30 En el análisis de GWAS para la RVT, el grupo con RVT estaba compuesto de todos los pacientes de genotipo 1 con RVT de la población de estudio nunca expuesta a interferón. El grupo sin RVT estaba compuesto de: 1) todos los pacientes de la población de pacientes retada nuevamente con interferón pegilado, y 2) por los pacientes de genotipo 1 sin RVT tratados con interferón pegilado + ribavirina de la población de estudio nunca tratados.

35 Se llevaron a cabo análisis exploratorios adicionales en el PSN de la región *IL28b* de origen caucásico según información de los propios pacientes en pacientes que no eran de genotipo 1, y en cada ensayo separadamente (ver más información en la sección de resultados).

40 Análisis de datos genotípicos

Se genotiparon las muestras para 1.016.423 marcadores en el Infinium[®] HD Assay Super Illumina[®], utilizando chips HumanOmni Quad (v1.0) y un escáner iScan. Se llevó a cabo un control de calidad inicial para calibrar a cero los PSN corrigiendo los resultados discordantes entre réplicas, el exceso de heterocigosidad, la baja tasa de respuesta ($< 0,95$), la separación de agrupaciones, la puntuación GenTrain, las intensidades y la anchura de agrupación. Un total de 25 muestras no pasaron las comprobaciones de calidad iniciales o los posteriores intentos de genotipado. Tras el control de calidad, se generaron 1.002.139 PSN con resultados de genotipo. Se calculó número de PSN por cada cromosoma, la distribución de frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg para la población de origen caucásico según propia información del paciente.

50 Análisis estadístico

Se evaluaron en un modelo univariante de regresión logística las asociaciones entre la respuesta virológica (RVT o RVS) y variables de línea base (edad, índice de masa corporal [IMC], nivel de ARN del VHC y cociente ALT, introducidos como variables continuas, y sexo, genotipo del VHC, diagnóstico histológico [presencia o ausencia de cirrosis] y raza, introducidos como variables categóricas).

Se utilizó la regresión logística (PROC LOGISTIC, SAS v.9.2) para las asociaciones entre PSN individuales y la respuesta/no respuesta tras el ajuste para IMC, sexo, edad, carga vírica, cociente ALT y componentes de análisis de componentes principales (PCA) de línea base.

60 El análisis de la ascendencia se basó en la PCA tal como proponen Purcell et al.¹⁶, utilizando una base de datos de ascendientes creada utilizando la población global ("pgt"). Se suplementó la población global con fundadores del HapMap de fase III procedentes de 11 grupos de sujetos étnicamente diversos y se analizaron en SAS JMP

Genomics (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Se compararon los componentes de PCA con y sin valores atípicos. Se definieron los valores atípicos como los individuos con ascendencia que se encontraba alejada por lo menos en 6 desviaciones estándares de la media en uno de los diez ejes principales de variación inferidos.

5 Los PSN que se encontraban en los cromosomas X e Y o en ADN mitocondrial fueron excluidos conjuntamente con los PSN que no se encontraban genotipados en los fundadores HapMap de fase III (número de versión 27) o que se encontraban en regiones con un desequilibrio de ligamiento conocidamente elevado (Chr5, 44-51.5Mb, Crom. 6, 24 a 36 Mb; Crom. 8, 8 a 12 Mb; Crom. 11, 42 a 58 Mb; Crom. 17, 40 a 43 Mb). Los PSN restantes se adelgazaron utilizando PLINK¹⁶ con un tamaño de ventana de 1.000, $r^2 < 0,25$ y un desplazamiento de ventana de 100.

10 La asociación entre respuesta virológica (RVT y RVS) y los PSN individuales se sometió a ensayo mediante análisis de regresión logística. Se llevaron a cabo ajustes para las características de línea base (IMC, sexo, edad, nivel de ARN del VHC de línea base, cociente ALT y componentes de la PCA). Se evaluó la significancia mediante pruebas de cociente de probabilidad (PCP).

15 Se definió el modelo nulo de la manera siguiente:

Respuesta virológica=IMC + sexo + edad + nivel de ARN del VHC + cociente ALT + componentes de PCA

20 En el modelo nulo se supuso que el efecto genético de los PSN era cero.

Se definió el modelo alternativo de la manera siguiente:

Respuesta virológica=IMC + sexo + edad + nivel de ARN del VHC + cociente ALT + componentes de PCA + PSN

25 Se compararon las estimaciones de máxima probabilidad para cada modelo alternativo (es decir, con PSN) con el modelo nulo correspondiente (es decir, sin PSN) utilizando las PCP, que presenta una distribución chi cuadrado y grados de libertad iguales al número de parámetros diferentes. Se introdujeron los PSN en el modelo como variables continuas (0, 1 y 2). Los componentes de la PCA representaban los cinco componentes principales en las poblaciones analizadas. Se analizaron modelos similares en la población de origen caucásico según propia información y en la población que no presentaba genotipo 1.

30 Se calculó el desequilibrio de ligamiento (DL) de PSN significativos ($p < 10^{-5}$) en la región de *IL-28* de la población caucásica "pgt". Se generó un gráfico de DL de r^2 en Haploview v4.1¹⁷, infiriendo los bloques de DL mediante el método de Gabriel et al.¹⁸

35 Resultados

40 Se disponía de muestras para un total de 406 pacientes nunca expuestos a tratamiento y 426 pacientes que no habían respondido a un curso anterior de tratamiento con peginterferón alfa-2b (12KD). El análisis de la RVT se basó en datos de 800 pacientes, incluyendo 363 individuos (45%) que habían producido una RVT y 437 individuos (55%) que no habían producido una RVT. El análisis de la RVS se basó en datos de 663 pacientes, incluyendo 245 individuos (37%) que habían producido una RVT y 418 individuos (63%) que no habían producido una RVS. Las características de línea base de los pacientes incluidos en el análisis de la RVT y la RVS se muestran en la Tabla 1.

45 Los modelos univariantes de regresión logística de los factores de línea base mostraron que el genotipo del VHC ($p=1,50 \times 10^{-25}$), la edad ($5,80 \times 10^{-18}$), el cociente LAT ($p=7,50 \times 10^{-10}$), la raza ($p=9,20 \times 10^{-7}$), el IMC ($p=4,70 \times 10^{-5}$) y el diagnóstico histológico ($p=1,30 \times 10^{-5}$) se encontraban significativamente asociados a la RVT, y que el genotipo del VHC ($p=4,30 \times 10^{-27}$), la edad ($p=5,50 \times 10^{-18}$), el cociente ALT ($p=2,10 \times 10^{-8}$), la raza ($p=2,10 \times 10^{-8}$), el diagnóstico histológico ($p=5,40 \times 10^{-7}$), la IMC ($p=7,20 \times 10^{-6}$) y el nivel de ARN del VHC ($p=0,0022$) se encontraban significativamente asociados a la RVS. Cabe indicar que sexo no se encontraba significativamente asociado a RVT ni a RVS y el nivel de ARN del VHC no se encontraba significativamente asociado al RVS.

Resultados de GWAS en la población global de genotipo 1

55 Se excluyó un total de 4 muestras analizadas para genotipo debido a los elevados coeficientes de parentesco (indicativos de un grado de parentesco elevado). El análisis de los datos de los pacientes de genotipo 1 incluyó 627 pacientes con estado de RVT conocido (215 respondedores [34,3%] y 412 no respondedores [65,7%]) y 516 pacientes con estado de RVS conocido (128 respondedores [24,8%] y 388 no respondedores [75,2%]).

Los resultados de asociación genómica para la RVS y la RVT se presentan según cromosoma en la figura 1. Se identificó una serie de valores de p altamente significativos en la región de *IL-28* en el cromosoma 19. Los gráficos de cuantil-cuantil demostraron que los valores de p esperados y observados concuerdan estrechamente, con la excepción de unas cuantas desviaciones grandes de los valores de p asociados al cromosoma 19 (figura 2). El análisis de regresión logística de la RVS y la RVT reveló 12 y 19 PSN, respectivamente, con $p < 10^{-5}$ (Tabla 2).

Los 6 PSN superiores asociados a RVS y RVT, respectivamente, eran idénticos y se encontraban dentro de la región de *IL-28* del cromosoma 19. Los dos PSN superiores para RVS y RVT eran rs12979860 ($p=1,4 \times 10^{-21}$ y $p=5,0 \times 10^{-26}$, respectivamente) y rs12980275 ($p=5,8 \times 10^{-18}$ y $p=4,9 \times 10^{-23}$, respectivamente). De los seis PSN restantes asociados a la RVS (Tabla 2), ninguno se encontraba asociado a la RVT, ninguno se localiza en el cromosoma 19 y cuatro (rs943897, rs17671102, rs4961441 y rs1892723) eran asociaciones espurias debido al número reducido de observaciones en la rara clase de homocigotos ($BB < 10$ individuos). De los 13 PSN restantes asociados a la RVT (Tabla 2), ninguno se encontraba asociado a la RVS, sólo uno (rs4803223) se encontraba situado en el cromosoma 19, y dos (rs1189800 y rs4975629) podrían ser asociaciones espurias.

Los análisis de regresión logística de todos los PSN con $p < 10^{-5}$ para cualquier modelo de RVS y RVT se muestran en la Tabla 3 para la población total y para el subgrupo de origen caucásico según información del propio paciente. Al repetir los análisis tras el ajuste para el efecto de rs12979860, ninguno de los marcadores se encontraba significativamente asociado a la RVS y sólo un marcador se encontraba significativamente asociado a la RVT (rs8099917, $p=0,0130$).

La posterior investigación del desequilibrio de ligamiento entre PSN en la región de *IL-28* presentada en la Tabla 3 demuestra una agrupación con un grado elevado de desequilibrio de ligamiento (entre rs12979860 y rs12980275, $r^2=0,98$) y una segunda agrupación de PSN posteriores que comprendía rs12980275, rs12979860, rs8109886 y rs8099917 (figura 3).

Los resultados genómicos para la RVS tras el ajuste para rs12979860 se muestran en la figura 1c. Los resultados del análisis de regresión logística para la RVS tras el ajuste para rs12979860 y la inclusión de no respondedores adicionales reveló 10 PSN adicionales con $p < 10^{-5}$ (Tabla 4). Resulta interesante que tres de los cinco más prominentes (rs10009948, rs10023606 y rs7673763) se encuentran situados en el cromosoma 4. Curiosamente estos se asociaban exclusivamente a la RVS y no a la RVT.

Análisis exploratorio de rs12979860 en la población de origen caucásico según información del propio paciente

Con el fin de caracterizar y entender mejor la asociación entre *IL28b*, los presentes inventores en primer lugar exploraron la asociación entre rs12979860 en no genotipo 1 en la población de origen caucásico según información del propio paciente. Con el mismo modelo de regresión logística que en GWAS, se observó una asociación marginalmente significativa entre RVS y el número de alelos C de rs12979860 ($OR=1,88$, IC al 95%=[0,97, 3,67], $p=0,06$) con un error nominal de tipo 1 de 5%. De manera similar, se observó una asociación significativa entre RVT y el número de alelos C de rs12979860 ($OR=2,27$, IC al 95% [1,12, 4,70], $p=0,02$).

Además, los presentes inventores describen la asociación entre rs12979860 en los dos ensayos separadamente. En la población nunca tratada, se observó una asociación entre RVT y el alelo C de rs12979860, con una OR de prácticamente 5 ($OR=4,98$, IC al 95% [2,35, 10,53], $p=2,6 \times 10^{-5}$). La asociación se observa constantemente en los tres estratos de tratamiento.

En la población de pacientes en los que fracasó la terapia de interferón pegilado, no se encontró ninguna asociación con la respuesta vírica sostenida. Sin embargo, persistía una asociación con rs12979860 al comparar RVT ($N=185$) y no RVT ($N=154$) ($OR=1,91$, [1,22, 2,96], $p=0,003$). La asociación era independiente de: la carga vírica en la línea base, el género, la edad, el tratamiento y el cociente ALT.

Referencias

1. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology* 2009;49:1335-1374.
2. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
3. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.
4. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Jr., Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin

- combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355.
5. Conjeevaram HS, Fried MW, Jeffers LJ, Terrault NA, Wiley-Lucas TE, Afdhal N, Brown RS, Belle SH, Hoofnagle JH, Kleiner DE, Howell CD. Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. *Gastroenterology* 2006; 131:470-477.
6. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006;130:231-264.
7. Missiha S, Heathcote J, Arenovich T, Khan K. Impact of asian race on response to combination therapy with peginterferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:2181-2188.
8. Reddy KR, Messinger D, Popescu M, Hadziyannis SJ. Peginterferon alpha-2a (40 kDa) and ribavirin: comparable rates of sustained virological response in sub-sets of older and younger HCV genotype 1 patients. *J Viral Hepat* 2009;16:724-731.
9. Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Goncalves FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Chaneac M, Reddy KR. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 2005;43:425-433.
10. Martinot-Peignoux M, Maylin S, Moucari R, Ripault MP, Boyer N, Cardoso AC, Giuily N, Castelnau C, Pouteau M, Stem C, Auperin A, Bedossa P, Asselah T, Marcellin P. Virological response at 4 weeks to predict outcome of hepatitis C treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 2009;14:501-511.
11. Asselah T, Bieche I, Sabbagh A, Bedossa P, Moreau R, Valla D, Vidaud M, Marcellin P. Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut* 2009;58:846-858.
12. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399-401.
13. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Muller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009;41:1100-1104.
14. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009;41:1105-1109.
15. Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di BA, Brandao-Mello CE, Reddy KR, Craxi A, Martin AO, Teuber G, Messinger D, Thommes JA, Tietz A. Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha2b: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;150:528-540.
16. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-575.
17. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-265.
18. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, Defelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296:2225-2229.
19. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998;282:103-107.
20. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798-801.
21. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di IJ, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Gunthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Mulhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY. Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-wide Association Study. *Gastroenterology* 2010.
22. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, McHutchison JG. Replicated association between an interleukin-28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin [manuscript in press]. *Gastroenterology* 2010.
23. Montes-Cano M, et al. IL28B genetic variants and hepatitis virusinfection by different viralgenotypes [manuscript in press]. *Hepatology* 2010.
24. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kottenko SV, MacDonald MR, Rice CM. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006; 131:1887-1898.
25. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 2005;79:3851-3854.

26. Siren J, Pirhonen J, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol* 2005;174:1932-1937.
27. Asselah T, Bieche I, Narguet S, Sabbagh A, Laurendeau I, Ripault MP, Boyer N, Martinot-Peignoux M, Valla D, Vidaud M, Marcellin P. Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2008;57:516-524.
28. Esteban M. Hepatitis C and evasion of the interferon system: a PKR paradigm. *CellHost Microbe* 2009;6:495-497.
29. Asselah T, Benhamou Y, Marcellin P. Protease and polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C. *Liver Int* 2009;29 Suppl 1:57-67.
30. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, Gale M, Jr. Regulation of interferon regulatory factor3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145-1148.
31. Reesink HW, Zeuzem S, Weegink CJ, Forestier N, van VA, van de Wetering de Rooij, McNair L, Purdy S, Kauffman R, Alam J, Jansen PL. Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology* 2006;131:997-1002.
32. Gane E, Roberts S, Stedman C, Angus P, Ritchie B, Elston R, Ipe D, Morcos P, Najera I, Chu T, Berrey M, Bradford W, Laughlin M, Shulman N, Smith P. Combination therapy with a nucleoside polymerase (R7128) and protease (R7227/ITMN-191) inhibitor in HCV: safety, pharmacokinetics, and virologic results from INFORM-1 [abstract 193]. *Hepatology* 2009;50 (Supplement):394-5A.
33. Askarieh G, Alsio A, Pugnale P, Negro F, Ferrari C, Neumann AU, Pawlotsky JM, Schalm SW, Zeuzem S, Norkrans G, Westin J, Soderholm J, Hellstrand K, Lagging M. Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009.
34. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, PetriA, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327:198-201.

TABLA 1

		Análisis de RVT (N=800)		Análisis de RVS (N=663)	
		Sin RVT (N=437)	RVT (N=363)	Sin RVS (N=437)	RVS (N=245)
Sexo	Femenino, N (%)	144 (33,0)	107 (29,5)	132 (31,6)	78 (31,8)
	Masculino, N (%)	293 (67,0)	256 (70,5)	286 (68,4)	167 (68,2)
Edad media ± SD, años		48,14 ± 8,89	41,97 ± 9,54	48,07 ± 9,03	40,87 ± 9,51
IMC medio ± SD, kg/m ²		28,12 ± 5,4	26,51 ± 5,41	28,16 ± 5,21	26,15 ± 5,64
Raza/etnicidad, n (%)					
Caucásico		392 (89,7)	288 (79,3)	369 (88,3)	196 (80,0)
Negro		39 (8,9)	10 (2,8)	37 (8,9)	5 (2,0)
Oriental		5 (1,1)	38 (10,5)	6 (1,4)	31 (12,7)
Otro		1 (0,2)	27 (7,4)	6 (1,4)	13 (5,3)
Cociente ALT media ± SD		2,21 ± 1,48	3,09 ± 2,25	2,29 ± 1,49	3,25 ± 2,5
Diagnóstico histológico, n (%) ^a					
Sin cirrosis		324 (74,1)	316 (87,1)	307 (73,4)	222 (90,6)
Cirrosis		111 (25,4)	47 (12,9)	109 (26,1)	23 (9,4)
Genotipo del VHC, n (%)					
1		412 (94,3)	215 (59,2)	388 (92,8)	128 (52,2)
No 1		25 (5,7)	148 (40,8)	30 (7,2)	117 (47,8)
ARN del VHC sérico, IU/ml x 10 ⁶		4,8 ± 5,8	6,3 ± 8,0	5,0 ± 6,0	6,2 ± 8,8

^a Diagnóstico histológico ausente para 2 no respondedores de RVT/RVS

TABLA 2

Resultados del análisis de regresión logística de RVS y RVT en la población global de genotipo 1 que muestra todos los PSN con p<10 ⁻⁵ en el análisis primario													
PSN	Cromosoma; gen (localización)	RVS						RVT					
		Nº de pacientes			Alelo (MAF)	valor de p	OR ^a ; IC al 95%	Nº de pacientes			Alelo (MAF)	valor de p	OR ^a ; IC al 95%
		AA	AB	BB				AB	AB	BB			
rs12979860	19; IL28B (UTR 5' flanqueante)	102	314	100	G:A (0,5)	1,4x10 ⁻²¹	0,11; 0,07-0,19	139	371	117	G:A (0,48)	5,00x10 ⁻¹⁰	0,15; 0,1-0,23
rs129802	19; IL28B (UTR 3')	116	317	83	A:G (0,47)	5,81x10 ⁻¹⁸	0,15; 0,09-	156	371	100	A:G (0,46)	4,90x10 ⁻²³	0,18; 0,12-

ES 2 525 290 T3

75	flanqueante)						0,24						0,26
rs81 0988 6	19; LOC441849 (UTR 3' flanqueante)	169	274	73	A:C (0,41)	2,22x 10 ⁻¹⁴	4,77; 3,06- 7,44	200	32 7	10 0	A:C (0,42)	1,55x1 0 ⁻¹⁸	4,13; 2,91- 5,85
rs80 9991 7	19; LOC441849 (UTR 3' flanqueante)	219	260	37	A:C (0,20)	5,75x 10 ⁻¹³	0,20; 0,12- 0,32	282	30 2	43	A:C (0,31)	4,92x1 0 ⁻¹⁷	0,23; 0,15- 0,33
rs12 9729 91	19; IL28B (UTR 3' flanqueante)	201	274	41	A:C (0,34)	2,05x 10 ⁻¹⁰	0,26; 0,17- 0,41	260	31 8	49	A:C (0,33)	1,45x1 0 ⁻¹⁸	0,22; 0,15- 0,31
rs95 5155	19; LOC728942 (UTR 5' flanqueante)	240	233	43	G:A (0,31)	2,19x 10 ⁻⁷	0,36; 0,25- 0,53	300	27 4	53	G:A (0,3)	9,77x1 0 ⁻¹⁰	0,37; 0,27- 0,52
rs94 9389 7	6; LOC44261 (UTR 3' flanqueante)	404	103	9	G:A (0,12)	1,07x 10 ⁻⁶	3,37; 2,06- 5,51						
rs17 6711 02	17; MS12 (UTR 3' flanqueante)	443	68	4	G:A (0,07)	1,18x 10 ⁻⁶	4,26; 2,36- 7,68						
rs98 6459 5	3; SUMF1 (intrón)	308	190	18	A:C (0,22)	2,49x 10 ⁻⁶	2,68; 1,76- 4,07						
rs49 6144 1	9; C9orf39 (intrón)	479	34	3	A:C (0,04)	2,62x 10 ⁻⁶	0,00; 0,00- 17,25						
rs18 9272 3	22; PIWIL3 (codificante)	464	51	1	A:G (0,05)	6,72x 10 ⁻⁶	4,63; 2,36- 9,08						
rs11 5844 2	14; KCNH5 (UTR 3' flanqueante)	153	236	12 6	A:G (0,47)	9,66x 10 ⁻⁶	0,48; 0,35- 0,67						
rs48 0322 3	19; LOC441849 (UTR 5' flanqueante)							372	22 6	29	A:G (0,23)	1,35x1 0 ⁻⁸	0,36; 0,25- 0,53

Tabla 2 (continuación)

Resultados del análisis de regresión logística de RVS y RVT en la población global de genotipo 1 que muestra todos los PSN con $p < 10^{-5}$ en el análisis primario													
PSN	Cromo soma; gen (localización)	RVS						RVT					
		Nº de pacientes			Alelo (MAF)	valor de p	OR ^a ; IC al 95%	Nº de pacientes			Alelo (MAF)	valor de p	OR ^a ; IC al 95%
		AA	AB	BB				AA	AB	BB			
rs11635085	15; C15orf32 (UTR 3' flanqueante)							418	184	24	A:C (0,19)	3,38 x10 ⁻⁶	0,43; 0,29-0,63
rs2037204	8; TACC1 (coding)							227	303	97	A:G (0,4)	4,84 x10 ⁻⁶	1,88; 1,43-2,48
rs189800	14; LOC440180 (UTR 5' flanqueante)							581	42	4	A:G (0,04)	5,51 x10 ⁻⁶	0,05; 0,01-0,39
rs2642940	3; LOC643634 (UTR 5' flanqueante)							296	259	72	A:G (0,32)	6,70 x10 ⁻⁶	0,52; 0,38-0,69
rs5015755	7; ZCWPW1 (intrón)							455	159	13	C:A (0,15)	7,03 x10 ⁻⁶	2,29; 1,59-3,3
rs2290841	10; ADAM12 (intron)							411	191	25	A:G (0,19)	7,06 x10 ⁻⁶	0,45; 0,31-0,65
rs4268783	16; CNTNAP4 (UTR)							293	264	60	G:A (0,31)	7,26 x10 ⁻⁶	1,92; 1,44-2,56
rs13252897	8;							237	298	92	G:A	7,29	1,87;

ES 2 525 290 T3

	TACC1 (intron)										(0,38)	$\times 10^{-6}$	1,41- 2,46
rs11643145	16; CNTN AP4 (intron)							275	276	76	C:A (0,34)	$7,96 \times 10^{-6}$	1,87; 1,41- 2,46
rs4975629	5; SLC6A 19 (cds- synon)							532	92	3	G:A (0,08)	$8,36 \times 10^{-6}$	0,26; 0,13- 0,5
rs3807475	7; ZCWP W1 (5' UTR)								160	12	G:A (0,15)	$8,74 \times 10^{-6}$	2,29; 1,59- 3,3

Tabla 2 (continuación)

Resultados del análisis de regresión logística de RVS y RVT en la población global de genotipo 1 que muestra todos los PSN con $p < 10^{-5}$ en el análisis primario													
SNP	Cromosoma; gen (localización)	RVS					RVT						
		Nº de pacientes			Alelo (MAF)	valor de p	OR ^a ; IC al 95%	Nº de pacientes			Alelo (MAF)	valor de p	OR ^a , IC al 95%
		AA	AB	BB				AA	AB	BB			
rs7597795	2; COL6A3 (intrón)							425	182	20	A:G (0,18)	$9,10 \times 10^{-6}$	0,41; 0,27- 0,62

IC al 95%=intervalo de confianza al 95%; MAF=frecuencia alélica menor; OD=cociente de probabilidades;
PSN=polimorfismo de un solo nucleótido a. Un OR>1 indica que la probabilidad de RVS o RVT se incrementa a medida que se incrementa el número de copias del alelo menor. A la inversa, una OR<1 indica que la probabilidad de RVS o RVT se reduce a medida que se reduce el número de copias del alelo menor.

TABLA 3

Resultados del análisis de regresión logística en la población global de genotipo 1 que muestra todos los PSN en la región IL28 con $p < 10^{-5}$ para RVS o RVT en el análisis primario												
PSN	RVS						RVT					
	Análisis primario		Nueva definición de no respondedores		Ajustado para rs12979860		Análisis primario		Nueva definición de no respondedores		Ajustado para rs12979860	
	Todos los pacientes	Caucásico	Todos los pacientes	Caucásico	Todos los pacientes	Caucásico	Todos los pacientes	Caucásico	Todos los pacientes	Caucásico	Todos los pacientes	Caucásico
rs12979860	$1,4 \times 10^{-21}$	$1,82 \times 10^{-19}$	$6,95 \times 10^{-19}$	$2,09 \times 10^{-17}$	NA	NA	$5,00 \times 10^{-26}$	$8,78 \times 10^{-26}$	$3,13 \times 10^{-16}$	$3,32 \times 10^{-26}$	NA	NA
rs12980275	$5,81 \times 10^{-18}$	$6,66 \times 10^{-16}$	$1,33 \times 10^{-15}$	$1,70 \times 10^{-14}$	0,8980	0,5867	$4,90 \times 10^{-23}$	$7,05 \times 10^{-23}$	$6,86 \times 10^{-23}$	$2,54 \times 10^{-23}$	0,4770	0,6033
rs8109886	$2,22 \times 10^{-14}$	$1,45 \times 10^{-14}$	$1,60 \times 10^{-12}$	$4,84 \times 10^{-13}$	0,9396	0,5251	$1,55 \times 10^{-11}$	$1,76 \times 10^{-19}$	$2,77 \times 10^{-18}$	$1,61 \times 10^{-19}$	0,3722	0,2354

ES 2 525 290 T3

rs8099917	5,75x10 ⁻¹³	5,55x10 ⁻¹¹	1,71x10 ⁻¹¹	1,70x10 ⁻¹⁰	0,1238	0,1316	4,92x10 ⁻¹⁷	1,89x10 ⁻¹⁵	2,02x10 ⁻¹⁷	4,44x10 ⁻¹⁶	0,0130	0,0379
rs12972991	2,05x10 ⁻¹⁰	8,40x10 ⁻¹⁰	8,76x10 ⁻⁹	1,30x10 ⁻⁸	0,6464	0,6463	1,45x10 ⁻¹⁸	7,50x10 ⁻¹⁸	4,99x10 ⁻¹⁸	1,44x10 ⁻¹¹	0,0449	0,0949
rs955155	2,19x10 ⁻⁷	6,22x10 ⁻⁷	1,04x10 ⁻⁶	1,44x10 ⁻⁶	0,9677	0,9581	9,77x10 ⁻¹⁰	1,08x10 ⁻⁹	1,31x10 ⁻⁹	1,03x10 ⁻⁹	0,6224	0,6471
rs4803223	2,06x10 ⁻⁵	8,67x10 ⁻⁵	7,38x10 ⁻⁵	8,77x10 ⁻⁵	0,9035	0,9058	1,35x10 ⁻⁸	1,55x10 ⁻⁸	2,23x10 ⁻⁸	7,14x10 ⁻⁹	0,1650	0,1648
rs12974792	0,00251	0,00196	0,00206	0,00136	0,7742	0,6772	6,61x10 ⁻⁵	2,72x10 ⁻⁵	2,37x10 ⁻⁵	1,13x10 ⁻⁵	0,3057	0,3169
rs11672479	0,00117	0,00105	0,00094	0,00073	0,6490	0,5308	4,62x10 ⁻⁵	3,01x10 ⁻⁵	1,56x10 ⁻⁵	1,23x10 ⁻⁵	0,2718	0,3068

TABLA 4

Resultados principales (PSN con p<10 ⁻⁵) de la regresión logística de RVS en la población global de genotipo 1 utilizando el modelo complementario que incluía el ajuste para rs12979860 en la población con no respondedores adicionales.											
PSN	Cro m.	Posición	Gen ^a	Localización ^a	Alelos	valor de p	Cociente de prob.*	MAF	N AA	N AB	N BB
rs10009948	4	88555708	-	-	A:G	2,96E-07	3,87 (2,3, 6,51)	0,13	401	101	14
rs6950645	7	103360672	RELN	intrón	A:G	9,76E-07	0,34 (0,21, 0,54)	0,27	279	193	41
rs10908429	1	152977528	KCNN3	intrón	G:A	1,49E-06	0,35 (0,22, 0,56)	0,28	263	214	39
rs10023606	4	88538319	-	-	A:C	2,34E-06	3,32 (2,02, 5,47)	0,14	382	123	11
rs7673763	4	88568046	NUDT9	intrón	C:A	3,93E-06	3,21 (1,96, 5,27)	0,14	384	117	15
rs11158442	14	62198792	KCNH5	UTR3' flaqueante	A:G	5,37E-06	0,44 (0,3, 0,64)	0,47	153	236	126
rs1552243	5	125872994	GRAMD3	UTR 3' flaqueante	A:G	5,65E-06	0,41 (0,28, 0,62)	0,43	184	221	111
rs2299219	7	86255781	GRM3	intrón	A:G	6,22E-06	0,31 (0,18, 0,53)	0,2	333	162	21
rs2646130	16	83510852	-	-	A:G	6,78E-06	0,34 (0,21, 0,56)	0,25	289	197	30
rs11953659	5	125893989	ALDH7A1	UTR 3' flaqueante	A:G	9,99E-06	0,43 (0,29, 0,64)	0,46	168	226	122

*OR>1 indica que, a medida que el número de copias del alelo menor se incrementa, un individuo presentará una probabilidad incrementada de respuesta *OR<1 indica que, a medida que el número de copias del alelo menor se incrementa, un individuo presentará una probabilidad reducida de respuesta a. Los valores de gen faltante y de localización no se encontraban en la base de datos del NCBI

LISTADO DE SECUENCIAS

5

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Polimorfismos de un solo nucleótido que predicen los resultados del tratamiento del VHC

5 <130> 26667 WO

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> SEC ID nº 1
<211> 52
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> r indica a o g

20 <400> 1
ctgtatcaaa aaaaaagca agtatrraga atccagtacc ctgatccac ac 52

<210> SEC ID nº 2
<211> 52
25 <212> ADN
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (27)..(27)
<223> k indica g o t

<400> 1
35 gtttcaatga taacttccta gaaaatkaat aactatgata ccactttaag aa 52

<210> SEC ID nº 3
<211> 52
40 <212> ADN
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
45 <223> k indica g o t

<400> 1
ttaaatttt gctttttaa acacctkaag tctgttgct aatttgata aa 52

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para predecir la respuesta virológica sostenida de un sujeto humano infectado por VHC al tratamiento de interferón, que comprende: proporcionar una muestra de dicho sujeto humano, detectar la presencia de un un polimorfismo de un solo nucleótido en el cromosoma 4 y determinar que dicho sujeto presenta una elevada probabilidad de respuesta virológica sostenida al tratamiento de interferón en el caso de que se encuentre presente dicho polimorfismo de un solo nucleótido, en el que dicho polimorfismo de un solo nucleótido es una G en rs10009948, que presenta la secuencia ilustrada en SEC ID nº 1.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto se encuentra infectado por VHC de genotipo 1.
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicho tratamiento de interferón comprende un tratamiento seleccionado de entre el grupo que monoterapia con peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2a con ribavirina o interferón alfa-2b con ribavirina.

Fig. 1A

RVS

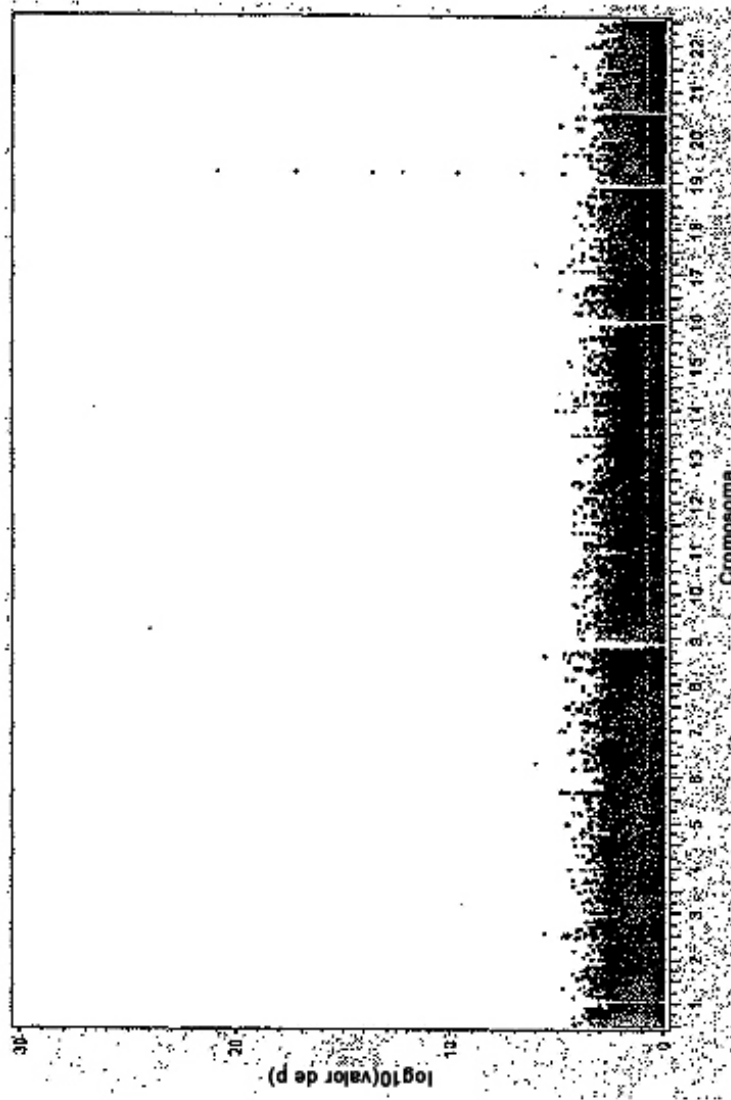


Fig. 1B

RVT



Fig. 1C

RVS tras el ajuste para rs12979860



Fig. 2A

RVS

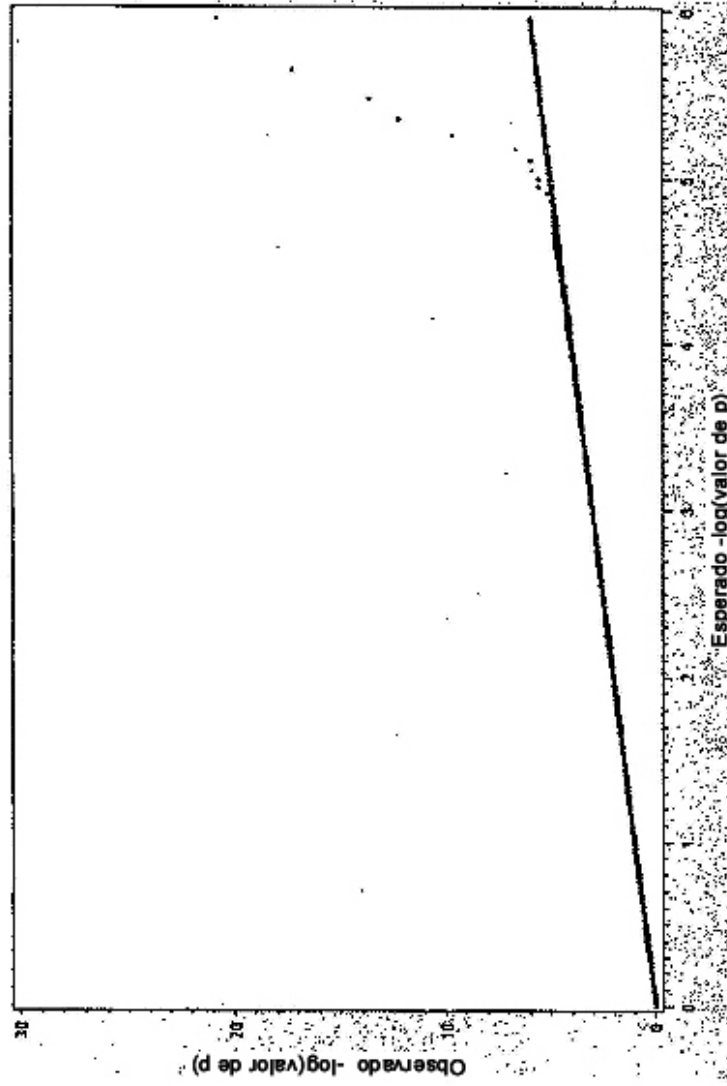
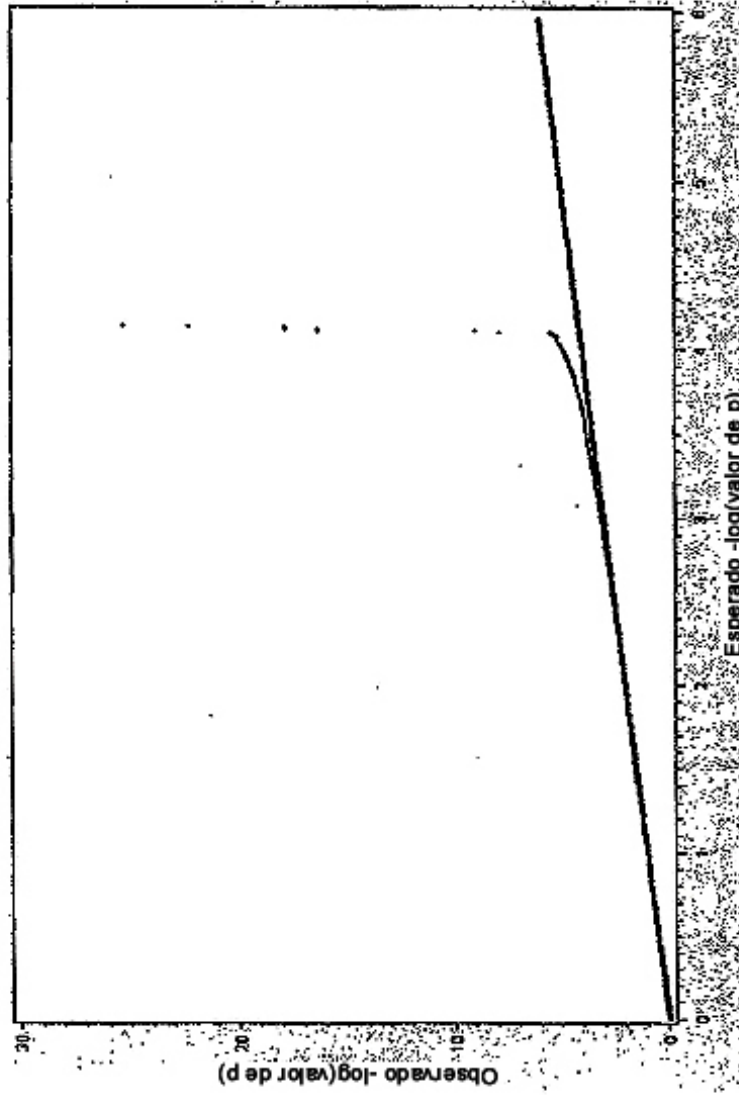


Fig. 2B

RVT



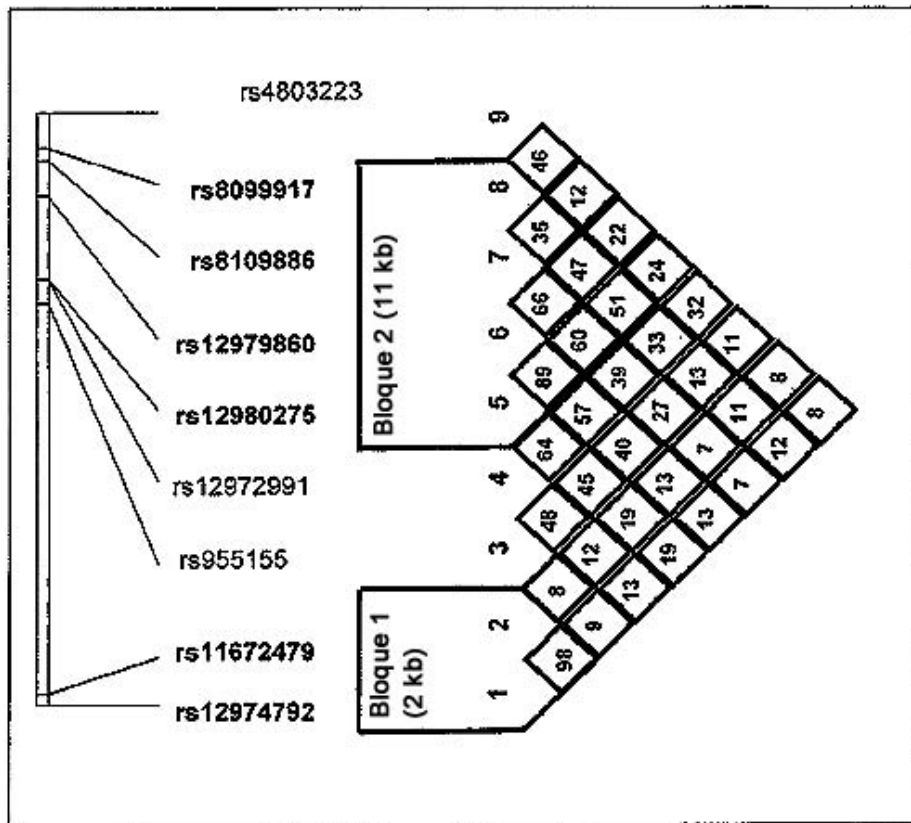


Fig. 3