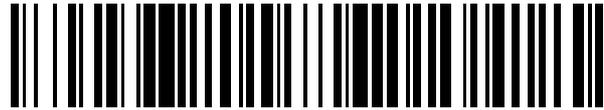


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 359**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10798090 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2516673**

54 Título: **Valor predictivo de polimorfismo génico IL28B combinado con cuantificación de IP-10 en suero de pretratamiento para respuesta a peginterferón y ribavirina mejora en comparación con cualquiera de estos biomarcadores solo**

30 Prioridad:

22.12.2009 EP 09180387

03.09.2010 EP 10175297

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

18.12.2015

73 Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (100.0%)
Eastgate Village, Eastgate
Little Island, County Cork, IE**

72 Inventor/es:

**AERSSENS, JEROEN;
FANNING, GREGORY CHARLES y
FRIED, MICHAEL W.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 554 359 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

Valor predictivo de polimorfismo génico IL28B combinado con cuantificación de IP-10 en suero de pretratamiento para respuesta a peginterferón y ribavirina mejora en comparación con cualquiera de estos biomarcadores solo

5 El virus de la hepatitis C (VHC), un miembro de la familia *Flaviviridae*, es un virus de transmisión sanguínea que provoca inflamación crónica del hígado, y puede conducir a la fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma. En todo el mundo, aproximadamente 170 millones de personas están infectadas con el VHC y opciones de tratamiento son limitadas. El nivel de cuidado actual para el tratamiento de la hepatitis C crónica consiste en una inyección semanal de interferón alfa (IFN- α) pegilado y la administración por vía oral dos veces al día de ribavirina (Fried y Hadziyannis, 2004, *Semin Liver Dis* 24 Supl 2, 47-54). Sin embargo, sólo el 40-50% de los pacientes infectados con los genotipos 1 ó 4 tratados con un régimen de 48 semanas logra una respuesta virológica sostenida (RVS) en comparación con el 80% de los pacientes infectados con los genotipos 2 ó 3. Por lo tanto, claramente existe un componente genotipo viral a la respuesta del tratamiento con IFN- α /ribavirina. Además de ello, Por otra parte, el nivel de cuidado actual se asocia, a menudo, con efectos adversos tales como la depresión y la anemia (Fried y Hadziyannis, 2004). Por lo tanto, existe una necesidad médica insatisfecha de nuevas opciones de tratamiento, más eficaces y más seguras para los pacientes con VHC.

Así, el nivel de cuidado para el tratamiento del genotipo 1 del VHC incluye actualmente 48 semanas de IFN- α pegilado y ribavirina, con un tiempo de seguimiento de 24 semanas para determinar si se ha logrado una respuesta virológica sostenida. Una respuesta virológica sostenida (RVS) se define como la ausencia de ARN del VHC detectable durante al menos 24 semanas después de suspender la terapia. La duración, el costo y la morbilidad relacionada con el tratamiento con estos agentes han establecido un deseo en el sector de comprender mejor la respuesta e identificar de antemano los pacientes que se beneficiarán de una modificación de la estrategia de tratamiento.

Recientemente se han generado datos que indican una contribución genética a la respuesta de IFN- α , con un fuerte vínculo entre polimorfismos de *IL28B* y el aclaramiento clínicamente determinado de virus en individuos infectados por el VHC de diversos orígenes étnicos. Estos datos apoyan un componente de acogida al fracaso del tratamiento implicado previamente por los marcadores séricos de citoquinas, siendo el más consistente el de los niveles séricos de IP-10 medidos antes del comienzo del tratamiento.

30 Proteínas IFN- λ , que han demostrado actividad anti-VHC, son codificadas por los genes *IL28 A/B* e *IL29* (Kotenko, et al 2003, *Nature Immunol* 4:69; Sheppard et al 2003, *Nature Immunol* 4:63); el gen *IL28B* que codifica interferón- λ 3 (IFN- λ 3). Estudios recientes han identificado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (rs12979860, SEQ ID NO: 1) tres kilobases (3 kb) aguas arriba del gen *IL28B* como un potencial marcador predictivo de la respuesta al tratamiento (Ge et al 2009, *Nature* 461:399). Este hallazgo fue confirmado por otros estudios independientes utilizando otros marcadores SNP (rs12980275, SEQ ID NO: 2 y rs8099917, SEQ ID NO: 3) situado próximo al gen *IL28B* (Suppiah et al 2009, *Nature Genetics* 41:1100; Tanaka et al 2009, *Nature Genetics* 41:1105). Se demostró que las variantes ventajosas se asocian fuertemente con más de una diferencia de dos veces en la respuesta al tratamiento farmacológico del VHC. A lo largo de una población multiétnica, aproximadamente el 80% de los pacientes que portan dos copias de la variante ventajosa aclaró el virus durante la terapia con IFN- α y se mantuvo libre de virus durante un período de 24 semanas después del tratamiento. La asociación genética parece ser importante en la predicción de respuesta en todos los grupos étnicos estudiados, incluyendo pacientes europeos, africanos y asiáticos. Estos estudios también proporcionan evidencia preliminar de que la expresión de ARNm de *IL28B* en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se ve afectada por el genotipo *IL28B* vinculada con la respuesta incrementada al tratamiento con IFN- α . En un estudio posterior también se demostró que este genotipo mejora firmemente la resolución y el tratamiento naturales inducidos por el aclaramiento viral de la infección por VHC entre los individuos de ambas ascendencias, europea y africana (Thomas et al 2009, *Nature* 461:798, Ge Dongling et al 2009, 461:399). Estos estudios han proporcionado una cierta promesa de que la respuesta a IFN- α podría predecirse en un entorno medicinal personalizado.

Antes de la identificación de la proteína 10 inducible por IFN- γ (IP-10 o CXCL10) como un marcador para la falta de respuesta, factor α de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina (IL) 1B, IL-10 e IL-8 habían sido identificados como marcadores séricos de la falta de respuesta al tratamiento con IFN- α . IP-10 mostró ser elevada en pacientes con VHC tanto en el hígado como en el suero, y se encontró que estos niveles eran más elevados en pacientes con VHC no respondedores que en respondedores a IFN- α . A continuación, esta observación fue confirmada en grandes conjuntos de datos, incluyendo el estudio DITTO europeo-caucásico, donde los niveles de referencia fueron el factor determinante más importante para la predicción de la respuesta al tratamiento (Romero et al 2006, *JID* 194:895; Lagging et al 2006, *Hepatology* 44:1617). Posteriormente, las hallazgos de IP-10 se extendieron a

pacientes co-infectados con VHC/VIH (Zeremski et al 2007, JAIDS 45:262), que fueron confirmados posteriormente en un segundo estudio y, adicionalmente, se correlacionaron con la inflamación hepática y la fibrosis en estos pacientes (Reiberger et al 2008, Antivir Ther 13:969). La asociación IP-10 también se ha demostrado en diferentes grupos raciales. (Fried et al, AASLD 2008, poster 1223).

5 En el sector ha surgido un punto de vista generalizado de que una respuesta inmune aumentada, indicada en el nivel de ARN, celular o proteína puede indicar una menor respuesta a una terapia con IFN- α /ribavirina, aunque esto no ha alcanzado un nivel de análisis o sofisticación como para ser utilizado clínicamente. A pesar de los marcadores conocidos, el mecanismo relacionado con la falta de respuesta sigue siendo poco claro. Además, aunque prometedor, el genotipo *IL28B* no explica todos los aspectos de la respuesta de interferón y cómo este hallazgo se relaciona con otros biomarcadores conocidos, tales como el genotipo viral, la carga viral, el peso, fibrosis, e IP-10 aún no está claro. El vínculo molecular entre la actividad del producto del gen *IL28B* de IFN- λ 3 y la expresión de genes inmunes sugiere que *IL28B* y los niveles de citoquinas y quimioquinas aguas abajo deben ser dependientes y, por lo tanto, marcadores séricos tales como IP-10 describirían efectivamente los mismos fenómenos fenotípicos.

15 El polimorfismo genético descrito recientemente en *IL28B* es extremadamente emocionante y puede proporcionar información pronóstica importante para el logro de una respuesta virológica sostenida a la terapia con peginterferón y ribavirina. Sin embargo, su utilidad clínica como una prueba independiente sigue siendo limitada. Para los genotipos CC, la probabilidad de SVR se estima en aproximadamente 80%. En contraste con el heterocigoto TC, la probabilidad de respuesta disminuye a aproximadamente 50%. Por lo tanto, el valor predictivo negativo o positivo de la prueba de genotipado es relativamente bajo, lo que disminuirá su uso en la decisión de realizar la terapia antiviral. Métodos para construir sobre sus capacidades predictivas que utilizan la prueba genética en combinación con otros marcadores fácilmente disponibles de la respuesta antiviral puede mejorar los valores predictivos positivos y negativos y mejorar su utilidad clínica.

25 Se da a conocer un análisis de muestras de VHC en caucasianos y afro-americanos en el que se ha determinado inesperadamente que los niveles en suero de IP-10 y el genotipo *IL28B* son predictores complementarios e independientes de la respuesta, y específicamente que los niveles medidos de IP-10 en pacientes infectados por el VHC heterocigóticos para el genotipo *IL28B*, u homocigotos para el genotipo no respondedor proporcionan un valor adicional en la determinación de la respuesta al tratamiento con IFN- α .

30 El marcador polimórfico de *IL28B* rs12979860 se puso a prueba utilizando el kit de discriminación alélica ABI TaqMan en 80 participantes de VIRALHEP-C, un ensayo clínico financiado por el NIH. Pacientes genotipados eran parte de un sub-estudio para los que se midió un panel de citoquinas séricas en sueros archivados (Fried et al, EASL 2008). El presente cohorte incluyó 40 SVR y 40 no respondedores, de los cuales 39 eran caucasianos y 41 afro-americanos. Los genotipos CC, CT o TT se encontraron en 19%, 61% y 20%, respectivamente, con correspondientes tasas de SVR de 87%, 47% y 25% ($\chi^2 = 13,4$, $p = 0,0012$), lo cual está en línea con el informe inicial de Ge et al (2009, Nature 461:399).

35 Los niveles medios de IP-10 en suero fueron similares y no parecían estar asociados con el genotipo *IL28B* ($p = 0,28$). Una tasa de SVR del 78% se encontró en pacientes con bajos (< 600 pg/ml) frente a 36% en pacientes con altos (> 600 pg/ml) niveles de IP-10 ($\chi^2 = 17,1$, $p < 0,0001$).

40 El nivel de IP-10 en suero dentro de los grupos de genotipo *IL28B* proporcionó información adicional e independiente sobre la probabilidad de SVR ($\chi^2 = 27,5$, $p < 0,0001$). Más específicamente, los portadores de CT con baja IP-10 tenían 79% de SVR frente al 34% con altos niveles de IP-10. Entre los portadores del TT se identificó una relación similar (50% para los de baja IP-10 frente al 10% para los de alta IP-10).

Genotipo <i>IL28B</i>	CC	CT	TT
% de SVR para el cohorte completo (n)	87% (13/15)	47% (23/49)	25% (4/16)
% de SVR para IP-10 < 600 pg/ml (n)	100% (7/7)	79% (11/14)	50% (3/6)
% de SVR para IP-10 > 600 pg/ml (n)	75% (6/8)	34% (12/35)	10% (1/10)

45 Así, cuando el genotipo *IL28B* se combina con la medición de IP-10 en suero de pretratamiento en genotipos no-CC, el valor predictivo para los pacientes individuales se mejora adicionalmente mediante la discriminación entre SVR y la falta de respuesta al peginterferón y ribavirina. Más específicamente, el ajuste del modelo lineal generalizado de SVR incluyendo tanto genotipo *IL28B* como suero de IP-10 como las variables explicativas demuestra un efecto contributivo importante de genotipo *IL28B* ($p < 0,0013$) e IP-10 en suero ($p < 0,0016$), pero no de la interacción entre *IL28B* e IP-10 ($p = 0,75$) en la estimación de la respuesta virológica sostenida.

Por lo tanto, la presente invención se refiere, en general, a un método de combinar la determinación del genotipo *IL28B* con la medición de nivel en suero antes del tratamiento de IP-10 para predecir el resultado de la respuesta virológica sostenida (SVR) o la falta de respuesta al peginterferón y ribavirina para pacientes individuales infectadas con el VHC.

5 En el sentido más amplio la invención se refiere a un método de combinar dos o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en la medición de nivel en suero antes del tratamiento de IP-10, la determinación del genotipo *IL28B*, la raza o la determinación de carga viral de hepatitis C para predecir el resultado de respuesta virológica sostenida (SVR) o la falta de respuesta al peginterferón y ribavirina para pacientes individuales infectadas con el VHC.

10 En el método en el que se combina la determinación del genotipo *IL28B* con la medición de nivel en suero antes del tratamiento de la IP-10, ya sea uno o ambos de los parámetros raza o determinación de la carga viral de hepatitis C puede ser añadido para la predicción de los resultados de la respuesta virológica sostenida (SVR) o la falta de respuesta al peginterferón y ribavirina para pacientes individuales infectados con el VHC.

Una característica de la invención es que el genotipo *IL28B* comprende el marcador polimórfico rs12979860.

15 Inesperadamente, la combinación de los resultados para el *genotipo IL28B* e IP-10 en suero mejora el valor predictivo negativo entre genotipos TT o TC para una respuesta virológica sostenida.

Parte de la invención es también un ensayo de diagnóstico que comprende medios para al menos la determinación o medición de polimorfismo de *IL28B* y los niveles de IP-10 en el suero de un paciente infectado por el VHC.

Sección de Ejemplos

20 EJEMPLO 1

Pacientes y Tratamiento

El estudio VIRAHÉP-C fue un estudio multicéntrico de la terapia de combinación de peginterferón y ribavirina de la hepatitis C crónica diseñado para evaluar las tasas y los predictores de respuesta entre AA y CA con infección por genotipo 1 y para identificar las razones de la falta de respuesta a la terapia. El diseño y los resultados primarios del ensayo VIRAHÉP-C se han reseñado en otras partes [Conjeevaram, H.S., et al., *Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. Gastroenterology*, 2006. 131 (2): págs. 470-7]. Los pacientes de 18 años y mayores que estaban sin tratamiento previo, infectados con el genotipo 1, tenían ARN del VHC detectable y tenían evidencia histológica de VHC crónica fueron elegibles para participar. Se excluyeron los pacientes con antecedentes de consumo de alcohol de más de 2 bebidas o el equivalente (20 g) por día o evidencia de abuso de alcohol en los 6 meses anteriores. Todos los pacientes habían sido sometidos a biopsia hepática dentro de los 18 meses de reclutamiento. Los pacientes fueron clasificados por raza, ya sea raza afro-americana o caucásica y por el origen étnico, ya sea como hispanos o no hispanos basado en el auto-informe. Se requería que todos los participantes hubiesen nacido en los Estados Unidos.

Los pacientes recibieron peginterferón alfa-2a (Pegasys, Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ) semanal 180 µg y ribavirina (Copegus, Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ) 1000-1200 mg al día durante al menos 24 semanas. Los pacientes que se convirtieron en VHC ARN-negativos en la semana 24 continuaron el tratamiento durante un total de 48 semanas, mientras que los que permanecieron siendo VHC ARN-positivos interrumpieron el tratamiento y fueron considerados no respondedores (NR). El criterio de valoración principal del ensayo fue una respuesta virológica sostenida (SVR), definida como la ausencia de ARN del VHC detectable durante al menos 24 semanas después de suspender la terapia.

Análisis de citoquinas del suero incluyendo IP-10

Cincuenta respondedores virológicos sostenidos (SVR) y 50 no respondedores (NR) a la terapia antiviral fueron elegidos de la cohorte VIRAHÉP-C y se incluyeron en los análisis de citoquina. No se incluyeron en este análisis retrospectivo recayentes a las 48 semanas de la terapia basada en IFN. La cohorte consistía en 51 afro-americanos (AA) y 49 americanos caucásicos (CA). La cohorte incluyó a 41 mujeres y 59 varones.

Cincuenta citoquinas diferentes se midieron en las muestras de suero recogidas al inicio del estudio utilizando los ensayos disponibles comercialmente humanos 23-plex y 27-plex panel de citoquinas Bioplex (BioRad, catálogo nº 171-A11123 y nº 171-A11127, respectivamente) en un sistema Luminex, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De las 50 citoquinas analizadas en los ensayos multiplex al inicio del estudio, 37 se pudieron cuantificar

de forma fiable en la mayoría de las muestras. Se prestó especial atención al análisis de los niveles de IP-10 en suero, que se determinaron como parte del ensayo de citoquina humana panel de 27-plex BioPlex. El intervalo dinámico de la medición de IP-10 en este ensayo es de 3,1 – 50,938 pg/ml, con un límite de detección a 6,5 pg/ml.

Genotipado de *IL28B*

5 El genotipado se realizó en un subconjunto de 80 pacientes (40 respondedores, 40 no respondedores) de los cuales se analizaron concentraciones de IP-10 en suero (véase más arriba). Este subgrupo de pacientes estaba compuesto por 39 AA y 41 CA.

10 El marcador polimórfico rs12979860 de *IL28B* se ensayó usando el kit ABI TaqMan de discriminación alélica y el Sistema de Detección de Secuencia ABI7900HT (Applied Biosystems), como se describe por *Thomas et al (Nature, 461:798-802, 2009)*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS o JMP (SAS Institute Inc). Los gráficos se realizaron con el software Tibco Spotfire o el software GraphPad Prism 4.

IP10 se asocia con SVR

15 Se han evaluado muestras de suero de 100 pacientes en el cohorte VIRAHÉP-C que se somete a tratamiento del VHC utilizando una gama completa de 50 citoquinas y quimioquinas con el fin de determinar si los perfiles de pre-tratamiento de citoquinas seleccionadas eran predictivos de una respuesta al tratamiento (respuesta virológica sostenida, SVR) en un cohorte americano bien caracterizado. De las 50 citoquinas analizadas, 37 se podían medir de forma fiable, como se muestra en el análisis del mapa térmico de respondedores frente a no respondedores en la FIGURA 1. Niveles basales de todas las citoquinas, excepto para IP-10 (véase más abajo), no fueron significativamente diferentes entre los respondedores y no respondedores.

25 La concentración media de IP-10 en suero al inicio del estudio era significativamente menor en respondedores comparación con los no respondedores (687 ± 68 pg/ml frente a 1149 ± 85 pg/ml, $p < 0,001$) (FIGURA 2A). Para evaluar el valor predictivo potencial de las mediciones de IP-10, los pacientes fueron estratificados de acuerdo con un valor umbral de 600 pg/ml, similar al que se aplicó en otros estudios anteriores.

30 [Zeremski, M., et al., Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2007. 45(3): págs. 262-8 // Butera, D., et al., Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood*, 2005. 106(4): págs. 1175-82. // Diago, M., et al., Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 2006. 55(3): págs. 374-9. // Lagging, M., et al., IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology*, 2006. 44(6): págs. 1617-25. // Narumi, S., et al., Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol*, 1997. 158(11): págs. 5536-44. // Romero, A.I., et al., Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*, 2006. 194(7): págs. 895-903.]

35 Setenta y nueve por ciento (26/33) de los individuos con un nivel referencia de IP-10 bajo (< 600 pg/ml) serán respondedores (valor predictivo positivo = 79%), mientras que el 64% (43/67) de las personas con un nivel referencia de IP-10 alto (> 600 pg/ml) serán no respondedores a la terapia (valor predictivo negativo = 64%) (FIGURA 2B). En general, esto da como resultado una especificidad del 52% (26/50) y una sensibilidad del 86% (43/50) para una prueba predictiva de la respuesta de la terapia basada en los niveles de IP-10 en suero de pre-tratamiento.

45 Sobre la base de un análisis de la matriz de correlación utilizando las 37 citoquinas evaluadas, ninguna otra citoquina se correlacionaba con IP-10 al inicio del estudio (FIGURA 3). Se observó que varios grupos de citoquinas se correlacionaban uno con otro en la línea base, pero ninguno se asoció con la respuesta al tratamiento. Es importante destacar que el análisis de las 37 citoquinas utilizando un modelo de validación cruzada reveló que ninguna citoquina añadida a IP-10 de la línea base mejoró su tasa de errores de clasificación de respondedores frente a los no respondedores (aproximadamente 30%).

El genotipo *IL28B* se asocia con SVR

La estratificación de la población de pacientes de acuerdo con el genotipo *IL28B* reveló una asociación significativa (cociente de probabilidad chi-cuadrado: $p < 0,0012$) con la respuesta al tratamiento (FIGURA 4), asociándose el genotipo CC a una alta tasa de SVR (87% SVR en el genotipo CC), mientras que el genotipo TT se asoció con los no respondedores (75% no respondedores en el genotipo TT).

5 Aditivo y efecto independiente del nivel sérico de IP10 y genotipo *IL28B*

Los niveles medios de IP-10 en el suero no eran significativamente diferentes entre los tres grupos de genotipo *IL28B*, tampoco cuando el genotipo CC se comparó frente a los grupos de genotipos CT y TT combinados (FIGURA 5).

10 A continuación, los pacientes fueron estratificados según el nivel de IP-10 por encima o por debajo del valor umbral de 600 pg/ml que se ha utilizado en varios estudios (véase arriba). A continuación, se analiza la estratificación basada en el nivel de IP-10 en suero de pretratamiento en combinación con el genotipo *IL28B*. Los datos tabulados de este análisis combinado se proporcionan en la FIGURA 6.

15 Este hallazgo demuestra que la predictividad para los pacientes individuales de (no) respuesta a peginterferón y ribavirina se puede mejorar de manera significativa por un análisis combinado de genotipo *IL28B* y la concentración de IP-10 en el suero de pretratamiento.

Más específicamente, los portadores de TC con baja IP-10 tenían 79% de SVR frente al 34% con alta IP-10. Entre los portadores de TT se identificó una relación similar (SVR = 50% para IP-10 baja frente a 10% para IP-10 alta). (Véase la Tabla 1).

20 TABLA 1 *Tabla sumario de los resultados del análisis combinado de genotipo IL28B y concentración de IP-10 en suero (encima o por debajo de 600 pg/ml) en relación con resultado de la terapia.*

Genotipo <i>IL28B</i>	CC	CT	TT
% de SVR para el cohorte completo (n)	87% (13/15)	47% (23/49)	25% (4/16)
% de SVR para IP-10 < 600 pg/ml (n)	100% (7/7)	79% (11/14)	50% (3/6)
% de SVR para IP-10 > 600 pg/ml (n)	75% (6/8)	34% (12/35)	10% (1/10)

25 La FIGURA 7 proporciona un panorama comparativo de los análisis individuales (genotipo *IL28B* y nivel de IP-10) y el análisis combinado. La prueba de chi-cuadrado para la homogeneidad que se realizó examina si dos o más poblaciones (p. ej., diferentes grupos de genotipo *IL28B*) tienen la misma proporción de observaciones con una característica común (es decir, la respuesta SVR). Ambos análisis individuales son significativamente predictivos de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, hay un efecto aditivo claro cuando se combinan ambos marcadores, lo que resulta en un mejor valor predictivo para los pacientes individuales, tanto de la respuesta como de la no respuesta al tratamiento. Este análisis combinado resulta en una estratificación altamente significativa de respondedores frente a no respondedores. Más específicamente, modelos lineales generalizados (SAS proc genmod) de SVR incluyendo tanto el genotipo *IL28B* como IP-10 del suero (por encima o por debajo de 600 pg/ml) como las variables explicativas demuestra un efecto contributivo importante de genotipo *IL28B* ($p < 0,0013$) e IP-10 en suero ($p < 0,0016$), pero no de la interacción entre *IL28B* e IP-10 ($p = 0,75$) en la estimación de la respuesta virológica sostenida.

35 Finalmente, el modelado de regresión logística de la respuesta SVR basado en niveles de IP-10 en suero (tratada como una variable continua) y genotipo *IL28B* (variable categórica) separa claramente respondedores y no respondedores según el nivel de IP-10 en suero, con un desplazamiento dependiente del genotipo *IL28B* en la curva de respuesta (FIGURA 8).

En conjunto, estos resultados demuestran que el valor predictivo de una combinación de nivel de IP-10 en suero de pretratamiento y genotipo *IL28B* supera a cada uno de los marcadores individuales en la predicción de respuesta virológica sostenida a la terapia con peginterferón y ribavirina, y mantiene la promesa para guiar la medicina personalizada en pacientes de VHC .

40 EJEMPLO 2

En este estudio los niveles de IP-10 de pre-tratamiento se midieron en muestras de suero de 272 pacientes en la cohorte VIRASHEP-C (115 no respondedores y 157 SVR). Este análisis demostró que IP-10 era igualmente predictiva de SVR en pacientes CA y AA. La combinación de niveles de IP-10 de suero de pretratamiento con genotipo *IL28B* se evaluó luego como predictores de respuesta a pegIFN y ribavirina en esta cohorte.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes. El estudio VIRAHEP-C fue un estudio multicéntrico de terapia de combinación de pegIFN y ribavirina de la hepatitis C crónica diseñado para evaluar las tasas y los predictores de respuesta entre AA y CA con infección por genotipo 1, y para identificar las razones de la falta de respuesta a la terapia. El diseño y los resultados primarios del ensayo VIRAHEP-C se han reseñado en otras partes [Conjeevaram, H.S., et al., *Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. Gastroenterology, 2006. 131(2): págs. 470-7*]. Los adultos que estaban sin tratamiento previo, infectados con el genotipo 1, tenían ARN del VHC detectable, y tenían evidencia histológica de VHC crónica fueron elegibles para participar. Los pacientes fueron clasificados por raza, ya sea como afro-americanos o caucasianos, y por origen étnico, ya sea como hispanos o no hispanos, basado en el auto-informe. Se requería que todos los participantes hubiesen nacido en los Estados Unidos. De 8 centros clínicos en los Estados Unidos, 401 pacientes se inscribieron y comenzaron la terapia entre julio de 2002 y diciembre de 2003.

Para el presente estudio, las muestras de suero se obtuvieron a partir de un subconjunto de 272 pacientes de la cohorte total VIRAHEP-C, que comprende 157 respondedores virológicos sostenidos (SVR) (104 CA, 53 AA) y 115 no respondedores (34 CA, 81 AA). Todas las muestras analizadas en este estudio fueron obtenidas bajo protocolos aprobados por IRB para los cuales los participantes dieron su consentimiento informado por escrito, incluyendo el consentimiento para las pruebas genéticas.

Tratamiento. Los pacientes recibieron peginterferón alfa-2a (Pegasys, Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ) semanalmente 180 µg y ribavirina (Copegus, Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ) 1000-1200 mg al día durante al menos 24 semanas. Los pacientes que se convirtieron en VHC ARN-negativos en la semana 24 continuaron el tratamiento durante un total de 48 semanas, mientras que los que permanecieron siendo VHC ARN-positivos interrumpieron el tratamiento y fueron considerados no respondedores. El criterio de valoración principal del ensayo era SVR, definida como la ausencia de ARN del VHC detectable durante al menos 24 semanas después de suspender la terapia.

Cuantificación de ARN del VHC. El ensayo de ARN del VHC se realizó en un laboratorio central (SeraCare BioServices, Gaithersburg, MD) utilizando el ensayo Cobas Amplicor (sensibilidad 50 UI/ml: Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA). Las muestras seleccionadas fueron analizadas para niveles de ARN del VHC mediante el ensayo monitor Cobas Amplicor y para el genotipo del ARN del VHC mediante el ensayo del genotipo de VHC Versant (Bayer, Tarrytown, NY).

Histología hepática. Todos los pacientes habían sido sometidos a biopsia hepática dentro de los 18 meses de la detección, que se leyeron de forma ciega por un patólogo central. Todas las biopsias fueron evaluadas en cuanto a la gravedad de la hepatitis C mediante la clasificación de la inflamación y la preparación de la fibrosis mediante el sistema de puntuación del índice de actividad histológica (HAI) modificado de Ishak.

Cuantificación de IP-10 en suero. La proteína-10 (IP-10) inducible por interferón y se midió en muestras de suero recogidas al inicio del estudio, antes del inicio del tratamiento, utilizando el inmunoensayo Quantikine humano CXCL10/IP-10 disponible comercialmente (R & D Systems). Todas las muestras se diluyeron 1: 2 y se analizaron por duplicado. El intervalo dinámico lineal de la medición de IP-10 en este ensayo fue de 8 - 500 pg/ml, con un límite de detección a 7,8 pg/ml. Las muestras con una concentración de IP-10 superior a 1000 pg/ml se diluyeron en la relación 1:5 y se volvieron a analizar.

Genotipado de *IL28B*. El marcador polimórfico rs12979860 de *IL28B* se analizó utilizando el kit de discriminación alélica ABI TaqMan y el Sistema de Detección de Secuencia ABI7900HT (Applied Biosystems) tal como se describe por Thomas et al (*Nature, 461: 798-802, 2009*). Las muestras de ADN fueron genotipadas de 210 pacientes de nuestra cohorte.

Métodos estadísticos. Análisis estadísticos estándar se realizaron utilizando JMP 7.0.2 o la versión 9.1 del software SAS (ambos de SAS Institute, Inc). Concentraciones de IP-10 fueron transformadas en logarítmicas antes de su uso en ensayos estadísticos para satisfacer las hipótesis de normalidad de distribución. Se utilizaron los paquetes disponibles al público en R (versión 2.8.0) para evaluar los diferentes modelos de clasificación (análisis discriminante lineal diagonal, bosque al azar, máquinas de vectores soporte y ensacado), así como los análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC). Modelos de regresión logística de ajuste y modelos lineales generalizados se realizaron, respectivamente, utilizando los procesos *logistic proc* y *proc genmod* en SAS. Los gráficos fueron hechos con las herramientas de software estadísticas utilizadas o con GraphPad Prisma 4 (GraphPad Software, Inc).

RESULTADOS

Pacientes incluidos en el cohorte de estudio.

5 Muestras de suero de 157 respondedores virológicos sostenidos (RVS) y 115 no respondedores a la terapia antiviral se incluyeron en la cohorte VIRAHÉP-C para este estudio. Las definiciones de la SVR y no respondedores se proporcionan en la sección anterior. Se excluyeron los pacientes con recidiva viral, avance o menos de 12 semanas de datos virológicos disponibles. La cohorte consistía en 134 AA y 138 CA. Las características basales de los pacientes de esta cohorte fueron las siguientes: edad $48,4 \pm 7,4$ años; carga viral $4,6 \pm 5,7 \times 10^6$ UI/ml; recuento de plaquetas $214 \pm 73 \times 10^6$ células/mm³; alanina transaminasa (ALT) $90,9 \pm 72,9$ UI/l; bilirrubina total $0,70 \pm 0,35$ mg/dl; albúmina de $4,1 \pm 0,40$ g/dl; y hematocrito $43,2 \pm 3,8\%$ (todos los datos como media \pm ET). La cohorte incluyó 96
10 mujeres y 176 hombres, y 19%, con un índice de fibrosis Ishak de 4-6. Las muestras de 210 de los 272 pacientes en nuestra cohorte estaban disponibles para el genotipado de *IL28B*, 123 SVR y 87 no respondedores de los cuales 111 fueron CA y 99 AA.

Medición de IP-10 en suero basal y respuesta del tratamiento.

15 Los niveles medios de IP-10 en suero eran significativamente más bajos en SVR en comparación con pacientes no respondedores (437 ± 31 pg/ml frente a 704 ± 44 pg/ml, $p < 0,001$) (Figura 9A, Tabla 2). Para evaluar el valor predictivo potencial de las mediciones de IP-10, se estratificaron los pacientes de acuerdo con un valor umbral de 600 pg/ml que se ha utilizado en estudios previos. Sesenta y nueve por ciento (129/188) de los individuos con un nivel de IP-10 basal bajo (<600 pg/ml) fueron respondedores (valor predictivo positivo, PPV = 69%), mientras que el 67% (56/83) de los individuos con un nivel de IP-10 basal alto (> 600 pg/ml) fueron no respondedores a la terapia (valor predictivo negativo, NPV = 67%) (Figura 9B). En general, este resultado en la especificidad de 82% (129/157) y una sensibilidad del 49% (56/115) para una prueba predictiva de la respuesta de la terapia basada en niveles de IP-10 en suero de pretratamiento.

25 Se evaluó el valor umbral de IP-10 de 600 pg/ml para identificar a los pacientes de SVR calculando el valor de corte con la mejor capacidad discriminatoria basada en una curva de análisis ROC. En el conjunto de datos de la solicitante, una concentración umbral de 370 pg/ml reveló la combinación óptima de especificidad (80%) y sensibilidad (56%) en la predicción de los pacientes de SVR. Se determinó el nivel óptimo de IP-10 para predecir correctamente tanto la SVR como la falta de respuesta. Un valor umbral de 550 pg/ml produjo la mayor tasa de positivos o negativos verdaderos (69%), y se correlacionó bien con el corte de 600 pg/ml que se ha utilizado en la bibliografía (68% de positivos o negativos verdaderos predichos en el conjunto de datos de la solicitante).
30 Finalmente, el análisis de regresión logística de concentraciones de IP-10 de pretratamiento permitió ajustar la probabilidad de SVR para niveles específicos de IP-10 medidos en pacientes individuales, y demostró un efecto altamente significativo de IP-10 ($p < 0,0001$; Figura 10, curva de color gris).

Efecto de la raza en niveles de IP-10 en suero.

35 Al comparar los niveles de IP-10 en suero de pre-tratamiento de CA y AA, no se observaron diferencias significativas en análisis separados de los respondedores ($p = 0,75$) y no respondedores ($p = 0,97$) (Tabla 2). La diferencia significativa ($p = 0,015$) en el nivel de IP-10 en suero de línea base entre CA y AA que se observó en el estudio de la cohorte total se puede explicar lo más probablemente por la composición desequilibrada de la cohorte (la tasa de respuesta al tratamiento con IFN en el subgrupo CA era 75 % en comparación con 40% en el subgrupo AA). La diferencia altamente significativa en el nivel de IP-10 en suero entre respondedores y no respondedores a la terapia con IFN se encontró tanto en CA como en AA (Tabla 2). Los análisis de regresión logística de los niveles de IP-10 de la línea base se utilizaron para generar curvas de respuesta al tratamiento para pacientes de CA y AA (Figura 10).
40 Las curvas de respuesta para pacientes de AA y CA revelaron un efecto significativo tanto de IP-10 ($p < 0,0001$) como de la raza ($p < 0,0001$), pero ninguna interacción significativa entre IP-10 y la raza ($p = 0,08$).

Genotipo *IL28B* y respuesta al tratamiento.

45 De los 210 pacientes genotipados, 30% eran CC, 49% eran CT y 21% eran TT. Se observó una asociación significativa entre el genotipo *IL28B* y la respuesta al tratamiento: tasas de SVR correspondientes eran 87% para CC, 50% para CT y el 39% para TT ($p < 0,0001$) (Tabla 3). Para caucasicos-americanos, 49% eran CC con una SVR del 91%, 41% eran CT con una SVR del 67% y 10% eran TT con una SVR del 45% ($p < 0,001$). Para los afro-americanos, sólo el 9% eran CC con una SVR del 67%, 58% eran CT con una SVR del 35% y 33% eran TT con una SVR del 36% ($p = 0,20$).
50

Asociación del genotipo *IL28B* y los niveles de IP-10 de pretratamiento con la respuesta al tratamiento.

Los niveles medios de IP-10 en suero eran similares para todos los pacientes, independientemente del genotipo *IL28B* tanto en los caucasianos ($p = 0,27$) como en los afro-americanos ($p = 0,58$) (Figura 11). Esta falta de correlación entre IP-10 en suero y genotipo *IL28B* indica que las asociaciones con SVR observadas para estos dos marcadores son independientes. Utilizando el corte de 600 pg/ml para los niveles de IP-10 de pretratamiento, la tasa de RVS para nuestra cohorte de pacientes con datos disponibles tanto con IP-10 en suero como del genotipo *IL28B* ($n = 210$) era de 69% para las personas con un bajo nivel de IP-10 (< 600 pg/ml) y 35% para las que tienen un alto nivel de IP-10 (> 600 pg/ml) ($p < 0,0001$).

El modelado de la SVR como una función del genotipo *IL28B* e IP-10 en suero (por encima o por debajo de 600 pg/ml) en una regresión logística nominal reveló un efecto aditivo significativo del genotipo *IL28B* ($p < 0,0001$) e IP-10 en suero ($p < 0,0015$) en la predicción de la SVR ($\text{Chi}^2 = 55$, $p < 0,001$), pero no existe interacción entre *IL28B* e IP-10 ($p = 0,66$). La Figura 12 visualiza que los niveles de IP-10 basales dentro de los grupos de genotipo *IL28B* proporcionaron información adicional e independiente con respecto a la tasa de SVR. Más específicamente, los niveles de IP-10 basales fueron de gran ayuda en portadores de alelos T de *IL28B*. La tasa de respuesta global para los portadores de TC era de 50%, pero para aquellos con bajos niveles de IP-10, 64% tenían una SVR frente al 24% con altos niveles de IP-10. Para el genotipo TT, el 39% tenía una SVR con el 48% en el grupo con bajo IP-10 de pretratamiento y el 20% en el grupo de alto IP-10. Modelos de regresión logística de la respuesta SVR basados en el nivel de IP-10 en suero tratada como una variable continua y el genotipo *IL28B* permitió una predicción más individualizada de la probabilidad de SVR de acuerdo con el nivel de IP-10 en suero, con un desplazamiento adicional y significativo dependiente del genotipo *IL28B* en la curva de respuesta (Figura 13). Análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC), que permiten una comparación más cuantitativa de modelos predictivos, reveló valores del área bajo la curva (AUC) ROC similares para el modelo basado en la IP-10 en suero de pretratamiento sola (0,71) frente a genotipo *IL28B* solo (0,70). Sin embargo, se logró un valor mucho más alto AUC ROC (0,80) para el modelo que combinaba ambos marcadores (Figura 14). Juntos, estos datos demuestran que la combinación de genotipo *IL28B* con las mediciones de IP-10 en suero de pretratamiento mejora claramente el valor predictivo de la SVR, especialmente en genotipos no CC.

También se encontró la misma tendencia significativa cuando el análisis se realizó por grupo racial (Tabla 4). Por ejemplo, en los afro-americanos, la diferencia con los niveles basales de IP-10 es aún más llamativa para los genotipos CT y TT *IL28B*. Para los portadores de TC con una IP-10 baja, la SVR fue del 48% frente al 17% con una IP-10 alta, mientras que para los portadores de TT con IP-10 baja, la SVR era del 43% frente al 25% con una IP-10 alta.

Combinación de genotipo *IL28B* y niveles de IP-10 de pretratamiento con otros parámetros de línea base para predecir la respuesta al tratamiento.

Se evaluó si otros parámetros de línea base, además del genotipo *IL28B* e IP-10 en suero podrían mejorar significativamente la predicción de la SVR. En este análisis, se añadieron la edad, el sexo, la raza, la carga viral de pretratamiento, la puntuación de la fibrosis Ishak, ALT, esteatosis y el índice de actividad histológica en un modelo de regresión logística. De todos los parámetros incluidos, sólo la carga viral de pretratamiento ($p < 0,0001$), el genotipo *IL28B* ($p = 0,0004$), el nivel basal de IP-10 ($p = 0,0033$) y la raza ($p = 0,0011$) contribuyeron de manera significativa al modelo. No había una interacción significativa entre cualquier par de variables (todas $p > 0,1$). Cuando todas las variables fueron tratadas como variables categóricas (p. ej., IP-10 por encima o por debajo de 600 pg/ml, más que como una variable continua), el modelo lineal generalizado resultante incluía las mismas cuatro variables significativas, más puntuación de la fibrosis ISHAK (Figura 15).

Los análisis de la curva ROC se realizaron para comparar la capacidad de predicción de los modelos que incluyen las variables más importantes identificadas en estos análisis multi-variables (Figura 14). El AUC del modelo que combinaba el genotipo *IL28B* e IP-10 en suero (AUC 0,80) superó claramente los modelos basados en las variables individuales, incluyendo el modelo basado en el genotipo *IL28B* solo (AUC 0,70). La adición de la raza y la carga viral basal mejoró aún más el modelo, aunque la ganancia adicional era modesta (AUC hasta 0,85).

TABLA 2. Niveles de IP-10 en suero de pretratamiento (pg/ml) en pacientes con VHC estratificados de acuerdo con la raza y la respuesta al tratamiento por interferón (SVR). Se encontró una diferencia significativa entre CA y AA para toda la cohorte ($p = 0,015$), pero no dentro de los subgrupos de respondedores o no respondedores.

	<u>Todas</u>	<u>SVR</u>	<u>No respondedor</u>	<u>test t</u>
Todas		437 ± 31 (n = 157)	704 ± 44 (n = 115)	p <0,001
Caucasiano	504 ± 38 (n = 138)	447 ± 44 (n = 104)	677 ± 69 (n = 34)	p <0,001
Afro-americano	598 ± 38 (n = 134)	418 ± 35 (n = 53)	716 ± 55 (n = 81)	p <0,001

5 TABLA 3. Tasa de RVS de acuerdo con el genotipo *IL28B* en toda la cohorte y estratificado por grupo racial.

<u>Genotipo IL28B</u>	<u>CC</u>	<u>CT</u>	<u>TT</u>	<u>Relación de probabilidad Chi²</u>
% SVR cohorte entera (n SVR / n total)	87% (55/63)	50% (51/103)	39% (17/44)	p <0,0001
% SVR CA (n SVR CA / n total CA)	91% (49/54)	67% (31/46)	45% (5/11)	p = 0,0008
% SVR AA (n SVR AA / n total AA)	67% (6/9)	35% (20/57)	36% (12/33)	p = 0,20

10 TABLA 4. Tasa de SVR (%) de acuerdo con una combinación de genotipo *IL28B* y el nivel de IP-10 en suero de pretratamiento (< 600 pg/ml: bajo; > 600 pg/ml: alto), estratificados por grupo racial. Los datos se expresan como % de SVR (n SVR / n total). Los análisis de la relación de probabilidad Chi² se realizaron para la prueba de homogeneidad de respuesta a lo largo de los grupos de la muestra.

	<u>Cáucaso-Americana</u>		<u>Afro-Americano</u>	
<u>IP-10</u>	<u>bajo</u>	<u>alto</u>	<u>Bajo</u>	<u>Alto</u>
<i>IL28B</i>				
CC	91% (40/44)	90% (9/10)	80% (4/5)	50% (2/4)
CT	79% (26/33)	38% (5/13)	48% (16/33)	17% (4/24)
TT	62% (5/8)	0% (0/3)	43% (9/21)	25% (3/12)
	Chi ² = 25,5, p <0.0001		Chi ² = 11,8, p = 0,037	

Descripción de las Figuras 1-15

15 FIGURA 1. Mapa térmico que representa las concentraciones séricas de pretratamiento de 37 citoquinas medidas en 50 pacientes de VHC respondedores (SVR) y 50 no respondedores a una terapia con interferón α / ribavirina.

20 FIGURA 2. Mediciones de IP-10 al inicio del estudio en respondedores frente a no respondedores a la terapia con IFN. [A] Se observó un nivel de IP-10 en suero significativamente más bajo ($p <0,001$) al inicio del estudio en los pacientes que respondieron al tratamiento con IFN frente a los no respondedores. Las líneas horizontales representan los valores medios por grupo. Para evaluar el valor predictivo potencial de las mediciones de IP-10 los individuos fueron agrupados de acuerdo a un valor umbral de 600 pg/ml (línea discontinua). [B] Se encontró una proporción significativamente menor de sujetos con altos niveles de IP-10 (> 600 pg/ml) en el grupo respondedor en comparación con el grupo no respondedor (Pearson Chi cuadrado = 16,3, $p <0,001$).

25 FIGURA 3. Matriz de correlación que incluye 37 citoquinas medidas al inicio del estudio en 100 pacientes con VHC (muestras de pretratamiento). Los recuadros azules indican correlaciones entre citoquinas superiores al 60% (azul claro), el 70% (azul medio) o el 80% (azul oscuro), respectivamente. Los cuadros en rojo indican las correlaciones de IP-10 con todas las otras 36 citoquinas (todas por debajo de 60%).

FIGURA 4. Distribución del genotipo *IL28B* (rs12979860) en respondedores y no respondedores a tratamiento con IFN α + ribavirina. Los datos se muestran como el número de pacientes (n) o como porcentaje de respondedores o no respondedores, respectivamente (Fila %). Una representación gráfica se muestra en el lado derecho de la figura.

5 FIGURA 5. Genotipo *IL28B* (rs12979860) en relación con concentraciones de IP-10 en suero de pre-tratamiento en 80 pacientes con VHC. Los pacientes fueron agrupados ya sea por genotipo *IL28B* (izquierda), o comparando el genotipo CC frente a genotipos CT /TT (derecha). No se observaron diferencias significativas asociadas con el genotipo *IL28B*.

10 FIGURA 6. Análisis combinado de genotipo *IL28B* y concentración de IP-10 en suero (por encima o por debajo de 600 pg/ml) en relación con resultado de la terapia. La figura muestra el número de pacientes (N) (panel izquierdo) como así como la fracción (como %) de los pacientes por genotipo y nivel de IP-10 que respondieron o no al tratamiento con IFN α / ribavirina.

15 FIGURA 7. Sumario gráfico comparando el valor predictivo de los resultados del tratamiento en pacientes con VHC, basado en el genotipo *IL28B* solamente (panel superior), nivel de IP-10 en suero solamente (panel central), y un análisis combinado de genotipo *IL28B* y el nivel de IP-10 en suero. Los porcentajes de las barras representan la fracción de respondedores de la SVR en el subgrupo particular. El número total de pacientes en cada subgrupo (bar) se muestran en la parte derecha de las barras.

20 FIGURA 8. Representación gráfica de un análisis de regresión logística ajustando la respuesta virológica sostenida (SVR) a tratamiento con peginterferón y ribavirina basado en niveles de IP-10 en suero (curva gris). A continuación, se añadió genotipo *IL28B* en el modelo, lo que resulta en una curva de regresión para cada uno de los genotipos (CC: azul, CT: rojo, TT: verde). El número relativamente pequeño de pacientes en cada uno de los subgrupos podría explicar que sólo la contribución de IP-10 en suero se reveló como un contribuyente importante ($p = 0,017$) en este modelo pero no el genotipo *IL28B* ($p = 0,31$) o la interacción entre IP -10 y *IL28B* ($p = 0,93$). Cada muestra del paciente se representa como un círculo en la parte superior (respondedor) o parte inferior (no respondedor) de la figura; los colores de los círculos representan el genotipo *IL28B*.

25 FIGURA 9. IP-10 en suero de pretratamiento (pg/ml) en pacientes respondedores (SVR) y no respondedores. (A) Gráfico de distribución de datos IP-10; (B) Representación de mosaico basada en niveles de IP-10 (estratificados por encima o por debajo de 600 pg/ml) y el resultado de respuesta al tratamiento.

30 FIGURA 10. Sumario gráfico de un análisis de regresión logística que ajusta la probabilidad de ser un respondedor (SVR) en base a los niveles de IP-10 en suero de pretratamiento (pg/ml), en la cohorte global (curva gris) o estratificado por grupo racial (caucásico-americano: rojo, afro-americano: azul). Cada una de las muestras del paciente se representa como un círculo en la parte superior (SVR) o en la parte inferior (no respondedor) de la figura. El modelo de regresión logística reveló un efecto significativo de IP-10 ($p < 0,0001$) y de la raza ($p < 0,0001$), pero ninguna interacción significativa entre IP-10 y la raza ($p = 0,08$).

35 FIGURA 11. IP-10 en suero de pretratamiento (pg/ml) en pacientes con VHC estratificados según el genotipo *IL28B* en (A) caucásicos-americanos y (B) afro-americanos. ANOVA de una vía no demostró diferencias significativas en el nivel de IP-10 de acuerdo con el genotipo *IL28B*.

40 FIGURA 12. Tasa de respuesta virológica sostenida (SVR) (%) en pacientes con VHC estratificados de acuerdo con IP-10 en suero de pretratamiento (por encima frente a por debajo de 600 pg/ml) y genotipo *IL28B*. La tasa de SVR de acuerdo con IP-10 en suero sola o genotipo *IL28B* solo se indica en las paredes verticales de la gráfica (fuente blanca). La tasa de la SVR y el número de pacientes (n SVR / n subgrupo total) se muestra el interior de la barra para cada uno de los subgrupos. El análisis de la relación de probabilidad Chi² confirmó la heterogeneidad de respuesta a través de los grupos de la muestra (Chi² = 55; $p < 0,0001$).

45 FIGURA 13. Sumario gráfico de un análisis de regresión logística que fija la respuesta virológica sostenida (SVR) de un tratamiento con peg-interferón y ribavirina basado sólo en niveles de IP-10 en suero (curva gris), o en base a un nivel de combinación de IP-10 en suero (pg/ml) y genotipo *IL28B* (CC: rojo, CT: verde, TT: azul). Cada una de las muestras del paciente se representa como un círculo en la parte superior (SVR) o en la parte inferior (no respondedor) de la figura; los colores de los círculos representan el genotipo *IL28B*. El modelo de regresión logística reveló un efecto significativo de IP-10 ($p < 0,0001$) y de genotipo *IL28B* ($p < 0,0001$), pero ninguna interacción significativa entre IP-10 y genotipo *IL28B* ($p = 0,3$).

FIGURA 14. Análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC) para IP-10 en suero de pretratamiento, genotipo *IL28B*, raza, carga viral del VHC basal, o una combinación de estos parámetros, en la predicción de la SVR de peg-interferón y ribavirina. Los números en la leyenda indican la estadística del área ROC bajo la curva (AUC) que puede utilizarse para la comparación del modelo.

- 5 FIGURA 15. Los predictores de respuesta virológica sostenida (SVR) para la terapia con pegIFN y ribavirina. Las relaciones impares ratio se calcularon a partir de un modelo de regresión logística incluyendo genotipo *IL28B* y mediciones basales (pretratamiento) de IP-10, carga viral del VHC, fase de la fibrosis (ISHAK), edad, sexo, alanina transaminasa (ALT), esteatosis (puntuación de grasa), e índice de actividad histológica portal y lobular (HAI).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tibotec Pharmaceuticals

5 <120> Valor predictivo de polimorfismo génico IL28B combinado con cuantificación de IP-10 en suero de pretratamiento para respuesta a peginterferón y ribavirina mejora en comparación con cualquiera de estos biomarcadores solo

<130> TIP 218 PCT

<150> EP09180387.4
<151> 22-12-2009

10 <150> EP10175297.0
<151> 03-09-2010

<160> 3

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 601
<212> ADN
20 <213> Homo sapiens

<300>
<308> rs12979860
<309> 17-07-2005
25 <310> (301).. (301)

<400> 1

caggactgcg gggacgagag ggcgtagag cgggcccgc cggggccatg cctctcccgc 60

ccactcccgg gcctcaccga tggccgcgga ggatcccctc tggggcggaa ggagcagttg 120

cgctgcccc agctcagcgc ctcttctctc tgcgggacaa gcggcgctta tcgcatacgg 180

ctaggcccc tcgccagggc ccctaacctc tgcacagtct gggattcctg gacgtggatg 240

ggtactggca gcgcacggtc gtgcctgtcg tgtactgaac caggagctc cccgaaggcg 300

ygaaccaggg ttgaattgca ctccgcgctc ccccagcaaa gccctcgcc cgcacctgga 360

gccgagtcct cccggcaggg ctcccttctg tgattgacct tgagcctgcg ttcgcgctga 420

cgacggggac tgcgggggtc tcgtggtggg aattgtgggc gctgacatag gagaggcgcc 480

tgctgggagc taggacgcag gacccttgg gacaggaacg ggtgtatggg aaccgggtgg 540

ggccagggtc ccagggggca caggggctgg gcggtgactt acgtagcggc ccctcagcgc 600

30 c 601

<210> 2
<211> 1001
<212> ADN
<213> Homo sapiens

35 <300>
<308> rs12980275
<309> 20-03-2004

ES 2 554 359 T3

<310> (501)..(501)

<400> 2

```

5  agagcaagac cctgtctcta aacttaaaga cagagagaga gagtccaggc gcggtagctc      60
   atgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc aaggccagtg gatcacctga gatcaggagt      120
   tcgagaccga cctggctaac atggtgaaac cccatttcta ctaaaactac aaaaaattag      180
   ctgggtgtgg tggcagacac ctgtaatccc agctactcgg gaggccgagg caggagattc      240
   acttgaaccg agcaggtgga ggttgacagt agccaagatc gcgccactac actccagctt      300
   gggcaacaag agcgaaactc tgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagag agcaagagga      360
   ggggaaggaag ttctgacaca tgctacaata aaaatgaact ttgaagacat tatgtcagtg      420
   aaataagcca gtctcaaaag aacaaatgct gtatgattcc ccctacatga ggtgctgaga      480
   gaagtcaaat tcctagaaac rgacgtgtct aaatatattgc cggggtagcg ggagggggtta      540
   ataggaagtt gttgtttaat gggtagacag attcaatttt gtaagatgaa gagagttctg      600
   gagattgctt gccgaacaat gtagcaaaca cactaggac cagacctgta atcccggcac      660
   tttgggaggc caaggggggc agatcacttg aggtcaggag ttcgagacca acctggccaa      720
   catggcaaaa ccccatctct actaaaaata cagtaattag ccaggcatct gactggctaa      780
   tggcacacac ctgtagtctc agctactcag gaggctgagg tgggaggatc acttgagcct      840
   aggaggtcga ggctgcaatg agctatgatc atgccagtgc cctccagcca gggtgacaga      900
   gcaaggtcct gtctcaaaaa aaaaaaata gaataataa ataataaat tgcactactg      960
   aacaatgtgc ttagaaaggg ataagatggt acattttgtg g                               1001

```

<210> 3

<211> 601

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<300>

<308> rs8099917

15 <309> 18-07-2005

<313> (301)..(301)

<400> 3

ES 2 554 359 T3

tgaaaaatac	acaaaaacat	aaaagaaaaa	aaacatcacc	tataacttca	ccatcctcct	60
ctcatccctc	atcccacttc	tggaacaaat	cgtcccaata	cataggaatt	ttccatgtgt	120
ttatgtgtgc	atatgttttc	tgactaccaa	agtaacactt	gttccttgta	aaagattcca	180
tccatacaaa	aacatacaac	atggagagtt	aaagtaagtc	ttgtatttca	cctcctggag	240
gtaaataatt	tttaacaatt	tgtcactggt	cctccttttg	ttttcctttc	tgtagcaat	300
ktcacccaaa	ttggaacat	gctgtataca	gtttggtagc	tggtttttta	tgtcttacca	360
ttatctctca	ttgcattct	cccacatctt	taattatagc	gtatcagtta	gggccagca	420
ggaaacagat	ggcccgtcaa	tttaggataa	ttgaggtgg	ggttgatacc	agaagccttt	480
ataaagcgat	tgatagtaa	aggcaaatga	caagagctag	tgcaagctcc	tgggccagc	540
atgggtgagg	ggcctcatcc	acaggcctaa	aggaagggga	gagggttgag	ggtgtgcatg	600
t						601

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de combinar la determinación del genotipo *IL28B* con medición de IP-10 del nivel en suero de pre-tratamiento para predecir el resultado de una respuesta virológica sostenida (SVR) o una no respuesta a peginterferón y ribavirina para pacientes individuales infectados con el VHC, en el que la determinación del genotipo *IL28B* comprende el marcador polimórfico rs12979860, y en el que el nivel de IP-10 en suero dentro de los grupos de genotipo *IL28B* proporciona una información adicional e independiente en relación con la probabilidad de la SVR, más específicamente
- portadores CC con IP-10 < 600 pg/ml tienen una posibilidad del 100% de una SVR frente al 75% cuando IP-10 > 600 pg/ml, o en donde
- 10 ● portadores CT con IP-10 < 600 pg/ml tienen una posibilidad del 79% de una SVR frente al 34% cuando IP-10 > 600 pg/ml, o en donde
- portadores TT con IP-10 < 600 pg/ml tienen una posibilidad del 50% de una SVR frente al 10% cuando IP-10 > 600 pg/ml.
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se añade el parámetro raza.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se añade la determinación de la carga viral de hepatitis C.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se añaden el parámetro raza y la determinación de la carga viral de hepatitis C.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la medición de combinación discrimina, además, entre SVR y no respuesta a peginterferón y ribavirina para un paciente individual infectado con VHC, en comparación con cualquiera de estos dos marcadores individuales (genotipo *IL28B*, nivel de IP-10 en suero).
- 20 6. Ensayo de diagnóstico para uso en el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende medio para al menos la determinación o medición de polimorfismo *IL28B* y niveles de IP-10 en suero de un paciente infectado con VHC.

25

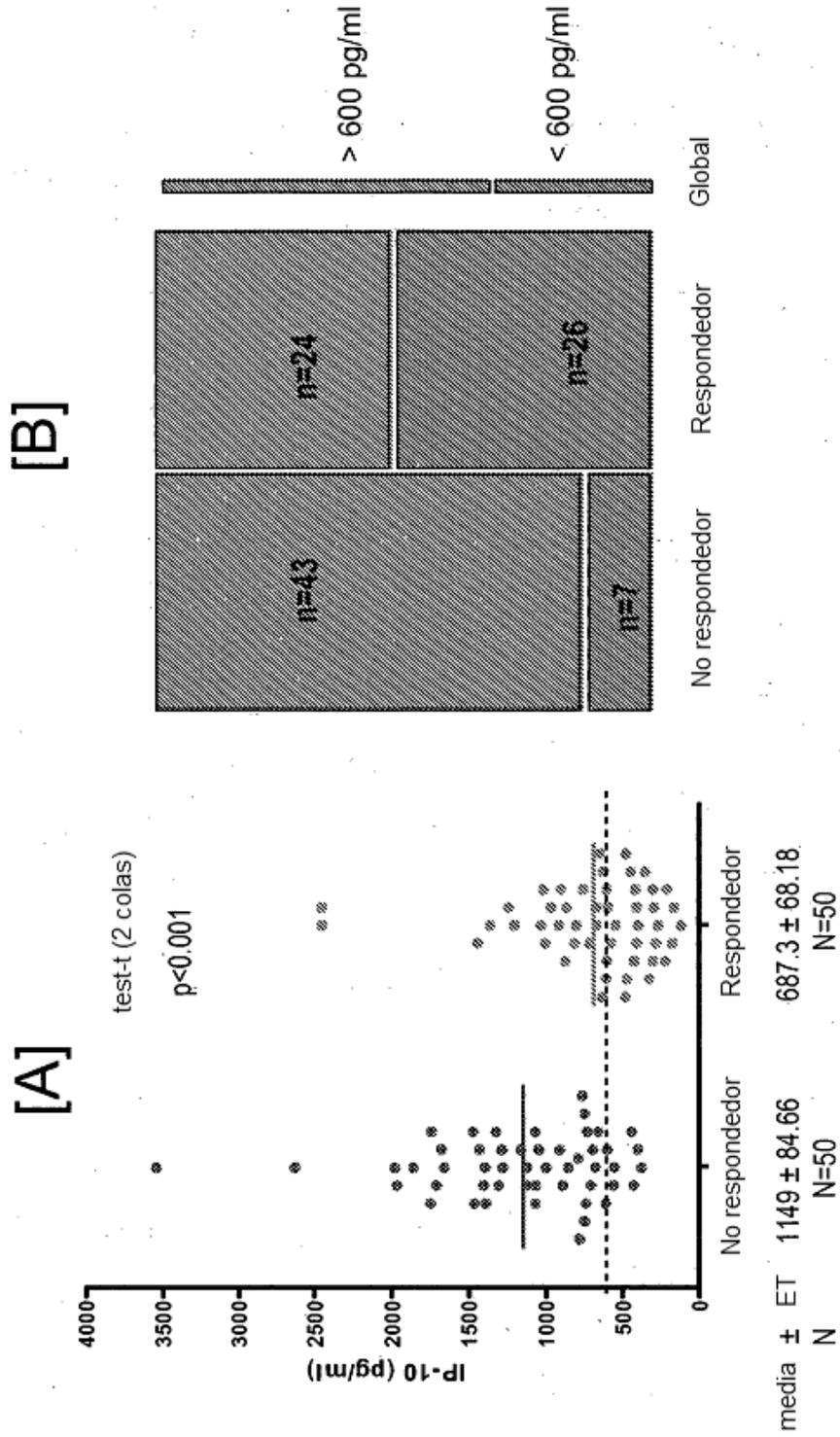


Figura 2

IL-7	1.00	0.73	0.68	0.60	0.53	0.50	0.41	0.38	0.44	0.32	0.45	0.18	-0.06	0.10	0.00	0.21	0.10	0.11	0.09	0.29	0.44	-0.17	0.03	-0.02	-0.04	0.13	-0.09	-0.09	0.02	-0.03	0.07	0.19	-0.11	0.21	0.19	0.00	0.27	
IL-4	0.73	1.00	0.79	0.88	0.87	0.73	0.58	0.54	0.52	0.44	0.57	0.32	0.20	0.34	0.20	0.40	0.30	0.22	0.19	0.16	0.23	0.43	-0.09	0.07	-0.10	-0.05	0.11	0.01	0.19	0.05	0.02	-0.02	0.24	0.02	0.04	0.12	-0.01	0.25
IL-12(p70)	0.68	0.79	1.00	0.78	0.79	0.76	0.60	0.77	0.70	0.62	0.71	0.42	0.18	0.33	0.15	0.35	0.26	0.13	0.37	0.50	-0.01	0.04	-0.10	0.01	0.03	-0.03	-0.05	0.04	0.10	-0.06	0.20	-0.12	0.07	0.36	0.03	0.18		
IFN-g	0.60	0.88	0.78	1.00	0.95	0.92	0.78	0.77	0.74	0.68	0.74	0.64	0.26	0.50	0.18	0.53	0.38	0.36	0.26	0.43	-0.04	0.04	-0.14	0.04	0.13	0.00	0.07	0.09	0.12	-0.03	0.33	-0.05	0.01	0.18	-0.02	0.22		
G-CSF	0.59	0.87	0.78	0.96	1.00	0.87	0.74	0.74	0.68	0.63	0.71	0.61	0.22	0.46	0.14	0.41	0.35	0.31	0.07	0.26	0.42	-0.09	0.08	-0.14	0.06	0.13	0.04	0.07	0.10	0.08	0.00	0.28	-0.02	0.00	0.14	0.01	0.23	
TNF-a	0.50	0.73	0.76	0.92	0.87	1.00	0.83	0.85	0.82	0.80	0.84	0.70	0.33	0.54	0.29	0.52	0.43	0.37	0.11	0.28	0.41	0.01	0.05	-0.15	0.05	0.05	-0.01	0.05	0.12	0.16	-0.05	0.27	-0.08	-0.02	0.20	-0.01	0.15	
IL-6	0.41	0.58	0.80	0.78	0.74	0.83	1.00	0.96	0.90	0.80	0.80	0.69	0.33	0.56	0.27	0.52	0.41	0.38	0.16	0.37	0.43	0.00	0.10	-0.15	0.11	0.08	-0.02	-0.05	-0.12	0.22	-0.04	0.24	-0.01	0.07	0.32	0.02	0.09	
IL-1ra	0.38	0.54	0.77	0.77	0.74	0.85	0.96	1.00	0.91	0.90	0.78	0.71	0.32	0.57	0.25	0.50	0.36	0.35	0.15	0.35	0.42	-0.01	0.09	-0.14	0.08	0.13	-0.01	-0.02	0.07	0.23	0.00	0.28	0.00	0.03	0.35	0.03	0.18	
GM-CSF	0.44	0.52	0.70	0.74	0.69	0.82	0.90	0.91	1.00	0.87	0.79	0.71	0.34	0.57	0.26	0.49	0.37	0.33	0.14	0.29	0.36	-0.02	0.08	-0.18	0.07	0.01	-0.04	-0.08	0.08	0.16	-0.01	0.28	-0.07	0.01	0.45	0.10	0.13	
Eotaxin	0.32	0.44	0.62	0.68	0.63	0.80	0.80	0.80	0.87	1.00	0.70	0.67	0.29	0.51	0.25	0.43	0.36	0.31	0.19	0.30	0.37	0.01	0.11	-0.19	0.10	0.09	0.05	0.00	0.11	0.26	0.03	0.26	-0.04	0.02	0.37	0.03	0.24	
IL-1b	0.45	0.57	0.71	0.74	0.71	0.84	0.80	0.78	0.79	1.00	0.61	0.61	0.28	0.47	0.22	0.45	0.40	0.25	0.06	0.29	0.38	0.06	0.03	-0.16	0.06	0.05	-0.08	0.02	0.07	0.15	0.00	0.24	-0.07	0.07	0.25	0.06	0.12	
IL-3	0.18	0.32	0.42	0.64	0.61	0.70	0.69	0.71	0.71	0.67	0.61	1.00	0.73	0.91	0.62	0.71	0.59	0.52	0.37	0.24	0.25	0.12	0.22	-0.15	0.35	0.11	0.12	-0.08	0.12	-0.35	0.00	0.10	0.17	0.00	0.13	-0.04	-0.03	
IFN-a2	-0.06	0.03	0.18	0.26	0.22	0.33	0.32	0.34	0.29	0.28	0.73	1.00	0.82	0.73	0.68	0.65	0.57	0.49	0.09	0.04	0.44	-0.19	-0.07	0.52	0.01	0.25	-0.06	0.09	0.43	-0.09	-0.17	0.18	-0.11	0.05	-0.01	-0.26		
MCP-3	0.10	0.20	0.33	0.50	0.46	0.54	0.56	0.57	0.57	0.51	0.47	0.91	0.82	1.00	0.51	0.73	0.71	0.63	0.52	0.17	0.17	0.16	0.21	-0.11	0.38	0.13	0.14	-0.07	0.10	0.33	0.01	0.04	0.17	-0.05	0.09	-0.04	-0.08	
TRAIL	0.00	0.04	0.15	0.18	0.14	0.29	0.27	0.25	0.26	0.25	0.22	0.62	0.73	0.61	1.00	0.52	0.61	0.56	0.49	0.05	-0.01	0.26	0.21	0.06	0.51	-0.02	0.25	0.01	0.18	-0.30	0.08	-0.25	0.27	0.09	-0.04	-0.07	-0.31	
SDF-1a	0.21	0.30	0.35	0.53	0.41	0.52	0.52	0.50	0.49	0.43	0.45	0.71	0.68	0.73	0.62	1.00	0.59	0.57	0.41	0.16	0.21	0.13	0.27	0.30	0.35	0.09	0.08	0.02	0.18	0.35	-0.07	0.08	0.11	-0.02	0.14	-0.05	-0.01	
IL-2Ra	0.10	0.22	0.26	0.38	0.35	0.43	0.41	0.36	0.37	0.36	0.40	0.69	0.65	0.71	0.61	1.00	0.66	0.63	0.18	0.19	0.10	0.28	-0.23	0.57	0.15	0.13	0.14	-0.07	0.32	-0.48	-0.05	-0.07	0.25	0.00	0.04	-0.05	-0.09	
SCF	0.11	0.19	0.22	0.36	0.31	0.37	0.38	0.35	0.33	0.31	0.25	0.62	0.57	0.63	0.56	0.57	1.00	0.45	0.13	0.14	0.17	0.42	0.36	0.28	-0.02	0.13	0.09	0.14	0.32	0.01	-0.01	0.17	0.06	-0.03	-0.04	-0.08		
b-NGF	0.09	0.10	0.13	0.09	0.07	0.11	0.16	0.15	0.14	0.19	0.06	0.37	0.49	0.52	0.49	0.41	0.63	0.45	1.00	0.09	0.08	0.34	-0.13	0.48	0.18	0.36	0.17	0.17	0.38	0.38	0.12	-0.20	0.47	0.15	0.02	0.02	-0.08	
IL-10	0.29	0.23	0.37	0.26	0.28	0.37	0.35	0.29	0.30	0.29	0.24	0.09	0.17	0.05	0.16	0.18	0.13	0.10	1.00	0.95	0.08	0.13	-0.04	0.13	0.03	0.05	-0.06	0.03	0.31	0.13	0.07	0.08	0.00	0.13	0.03	0.12		
IL-13	0.44	0.43	0.50	0.43	0.42	0.41	0.43	0.42	0.36	0.37	0.38	0.25	0.04	0.17	-0.01	0.21	0.19	0.14	0.09	0.95	1.00	0.02	0.18	-0.05	0.10	0.12	0.03	-0.02	0.05	0.29	0.14	0.19	0.03	0.00	0.19	0.06	0.33	
CTACK	-0.17	-0.09	-0.01	-0.04	-0.09	0.01	0.00	-0.01	0.02	0.01	0.06	0.12	0.44	0.16	0.26	0.13	0.10	0.17	0.08	0.08	1.00	0.03	-0.14	0.19	-0.13	0.10	0.01	0.06	0.37	-0.17	-0.12	0.17	-0.16	-0.09	-0.07	-0.25		
M-CSF	0.03	0.07	0.04	0.08	0.08	0.06	0.10	0.09	0.08	0.11	0.03	0.22	0.19	0.21	0.21	0.27	0.28	0.37	0.34	0.13	0.18	0.03	1.00	-0.05	0.29	0.31	0.20	0.08	0.16	0.30	0.11	-0.07	0.09	0.09	0.18	0.00	0.09	
GROa	-0.02	-0.10	-0.10	-0.14	-0.14	-0.15	-0.14	-0.18	-0.19	-0.16	-0.15	-0.07	-0.11	0.06	-0.30	-0.23	-0.11	-0.13	-0.04	-0.05	-0.14	-0.05	1.00	-0.13	-0.11	-0.13	-0.04	-0.09	-0.12	0.03	0.13	0.03	-0.06	-0.08	0.02	0.04		
HGF	-0.04	-0.05	0.01	0.04	0.05	0.11	0.08	0.07	0.10	0.06	0.35	0.52	0.38	0.51	0.35	0.57	0.42	0.48	0.13	0.10	0.19	0.29	-0.13	1.00	0.22	0.41	0.10	0.38	0.38	0.12	-0.20	0.47	0.15	0.02	0.02	0.02	-0.08	
IL-16	0.13	0.11	0.03	0.13	0.13	0.05	0.08	0.13	0.01	0.09	0.05	0.11	0.01	0.13	-0.02	0.09	0.15	0.36	0.18	0.03	0.12	-0.13	0.31	-0.11	0.22	1.00	0.21	0.00	0.05	0.12	0.25	0.12	0.07	0.23	0.00	-0.06	0.31	
IL-18	-0.09	0.01	-0.03	0.00	0.04	-0.01	-0.02	-0.01	-0.04	0.05	-0.08	0.12	0.25	0.14	0.25	0.08	0.31	0.28	0.36	0.05	0.03	0.10	0.20	-0.13	0.41	0.21	1.00	0.19	0.09	0.37	0.23	-0.13	0.21	0.04	0.02	-0.03	-0.03	
IP-10	-0.08	0.10	-0.05	0.07	0.07	0.05	-0.05	-0.02	-0.08	0.02	-0.08	-0.06	-0.07	0.01	0.02	0.03	-0.09	0.17	-0.06	-0.02	0.01	0.08	-0.04	0.10	0.00	0.19	1.00	0.15	0.01	0.24	-0.12	0.13	0.15	0.06	0.20	-0.05		
MIF	0.02	0.05	0.04	0.09	0.10	0.12	0.12	0.07	0.08	0.11	0.07	0.12	0.09	0.10	0.18	0.18	0.32	0.14	0.17	0.03	0.05	0.06	0.16	-0.09	0.38	0.05	0.09	0.21	0.05	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
MIG	-0.03	0.02	0.10	0.12	0.08	0.16	0.22	0.23	0.16	0.26	0.15	0.35	0.43	0.33	0.30	0.35	0.48	0.32	0.32	0.31	0.29	0.37	0.30	-0.12	0.38	0.12	0.37	0.01	0.10	1.00	-0.06	-0.06	0.23	-0.08	0.05	-0.10	0.05	
MIP-1b	0.07	-0.02	-0.06	-0.03	0.00	-0.05	-0.04	0.00	-0.01	0.03	0.00	0.00	-0.09	0.01	0.08	-0.07	-0.05	0.01	0.07	0.13	0.14	-0.17	0.03	0.12	0.25	0.23	0.24	-0.11	-0.06	1.00	0.10	-0.11	-0.09	0.21	0.05	0.02	0.01	0.00
PDGF-bb	0.19	0.24	0.20	0.33	0.28	0.27	0.24	0.28	0.28	0.24	0.20	0.10	-0.17	0.04	0.02	0.08	-0.01	-0.02	0.07	0.19	-0.12	-0.07	0.13	-0.20	0.13	-0.20	0.13	-0.13	-0.09	-0.06	0.10	1.00	-0.10	-0.06	0.16	0.02	0.50	
SCGF-b	-0.11	-0.05	-0.12	-0.05	-0.02	-0.08	-0.01	0.00	-0.07	-0.04	-0.07	0.17	0.17	0.27	0.11	0.25	0.17	0.33	0.08	0.03	0.17	0.09	0.03	0.47	0.07	0.21	0.13	0.21	0.23	0.08	-0.10	1.00	0.04	-0.18	-0.07	-0.14		
IL-8	0.21	0.04	0.07	0.01	0.06	-0.02	0.07	0.03	0.01	0.02	0.07	0.00	-0.11	-0.05	0.09	-0.02	0.00	0.06	0.12	0.00	0.00	-0.16	0.09	-0.06	0.15	0.23	0.04	0.75	0.05	-0.08	0.55	-0.06	0.04	1.00	0.13	0.18	0.02	
IL-9	0.19	0.12	0.36	0.18	0.14	0.20	0.32	0.35	0.45	0.37	0.25	0.13	0.05	0.09	-0.04	0.14	0.04	-0.03	0.07	0.13	0.19	-0.09	0.18	-0.08	0.02	0.00	0.02	0.06	0.02	0.05	0.07	0.16	-0.18	0.13	1.00	0.17	0.14	
MIP-1a	0.00	-0.01	0.03	-0.02	0.01	-0.01	0.02	0.03	0.10	0.03	0.06	-0.04	-0.01	-0.04	-0.07	-0.05	-0.04	-0.13	0.03	0.06	-0.07	0.00	0.02	0.02	-0.06	-0.03												

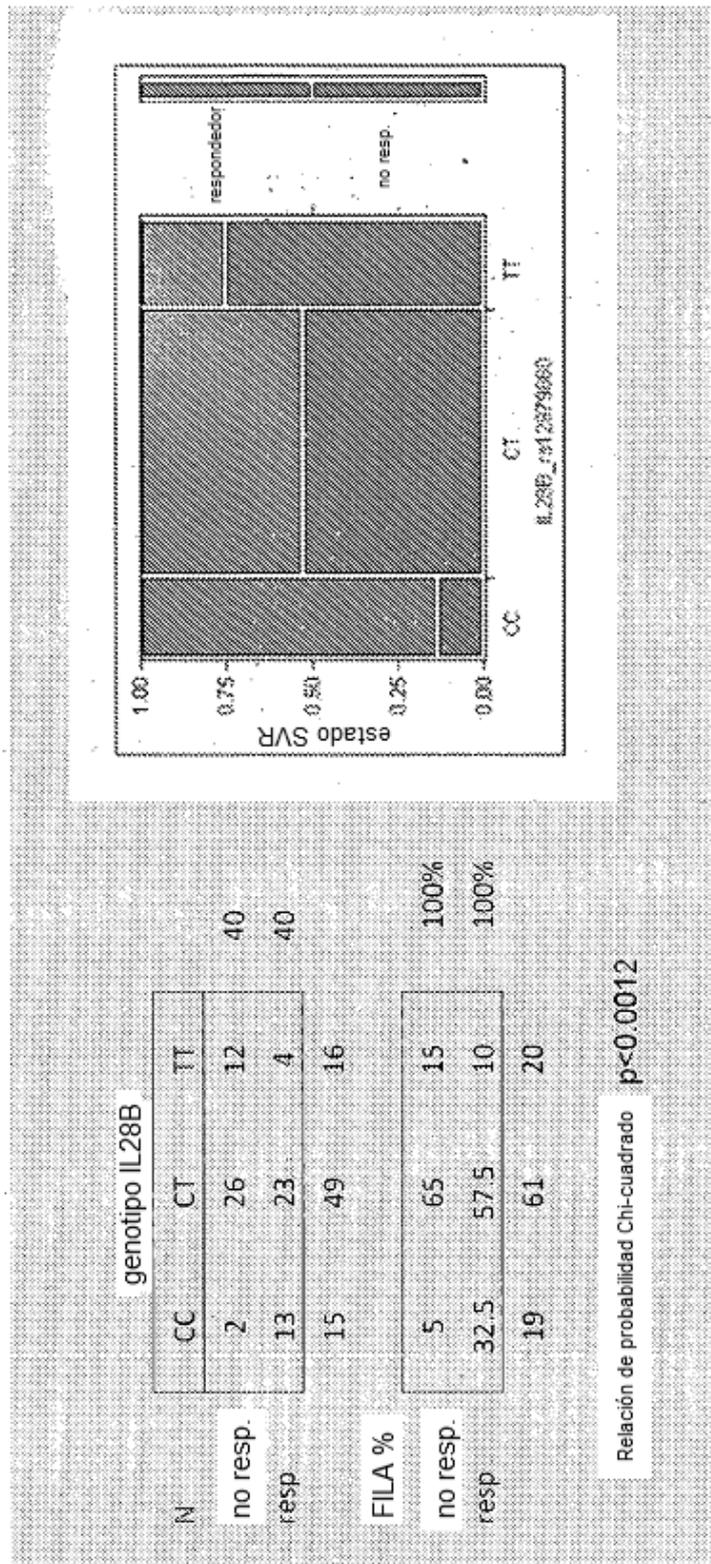


Figura 4

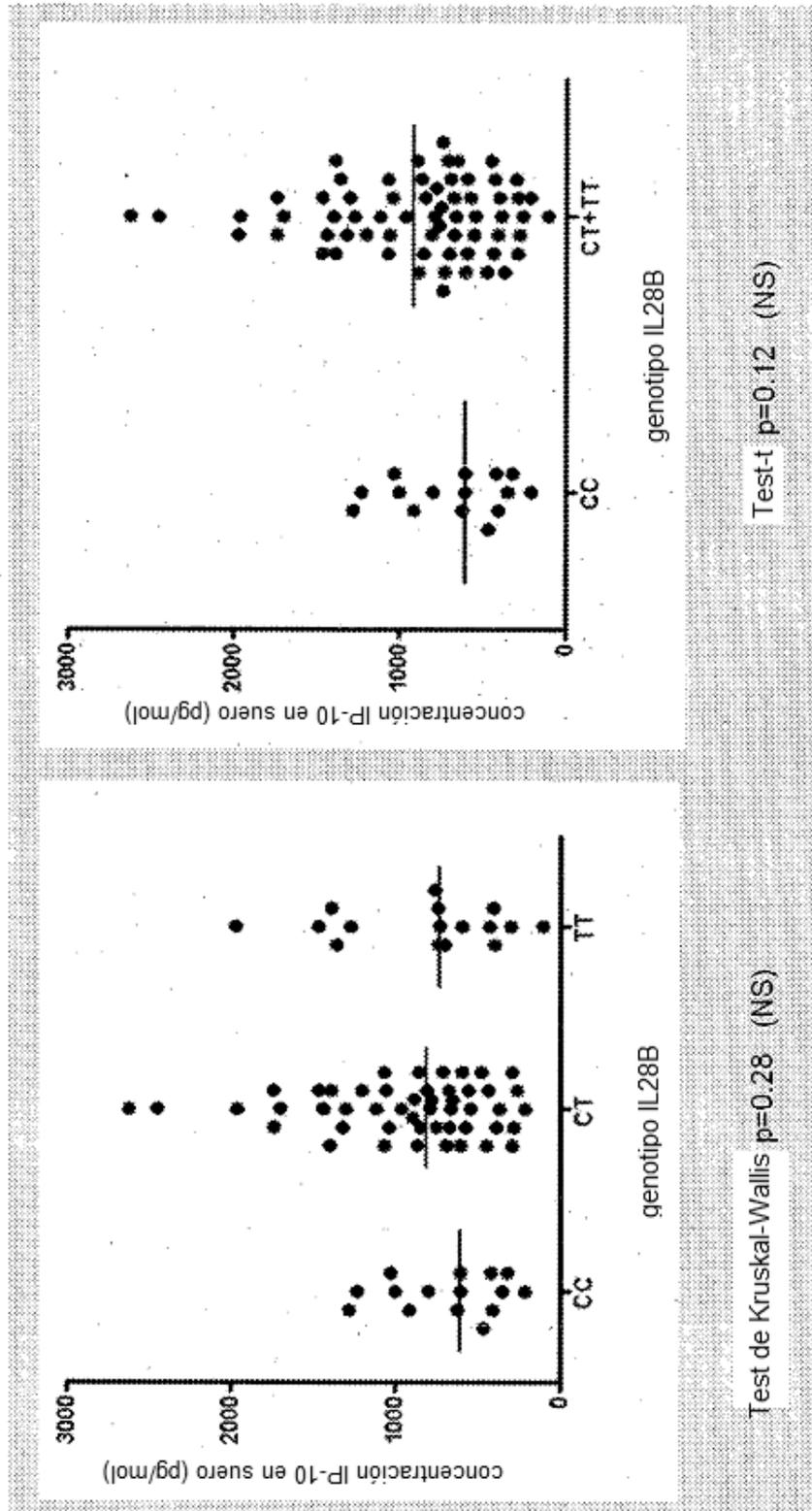


Figura 5

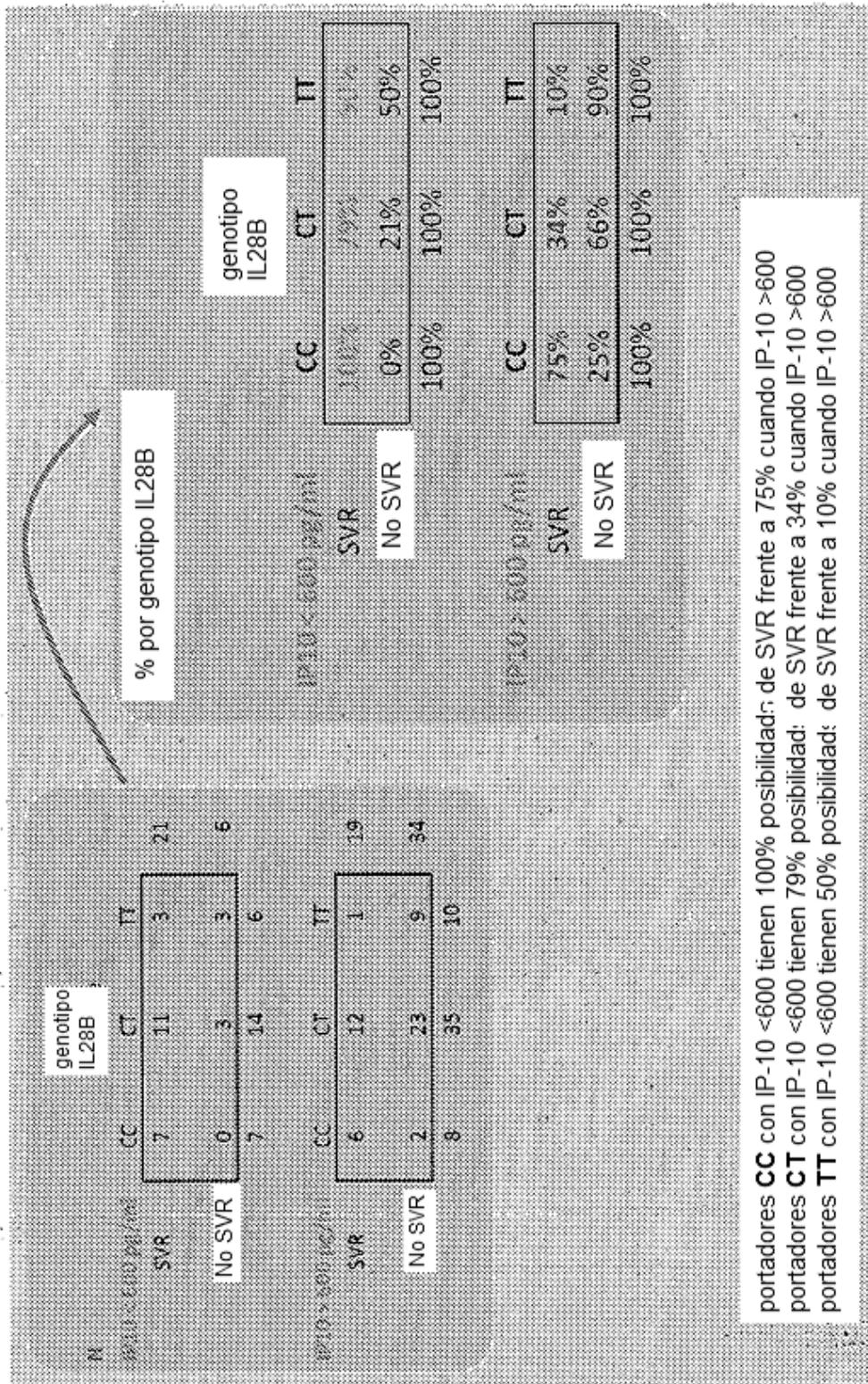


Figura 6

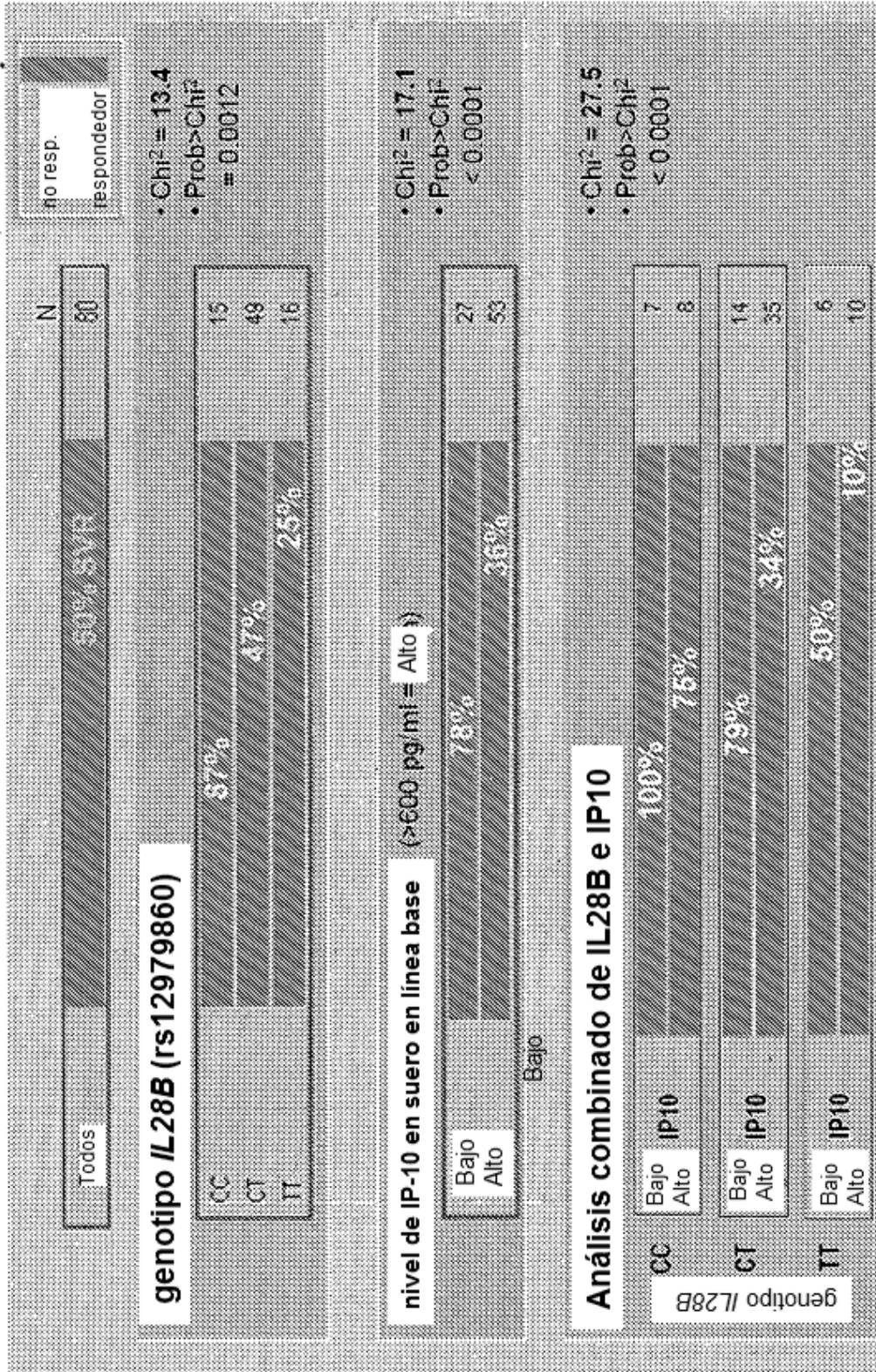


Figura 7

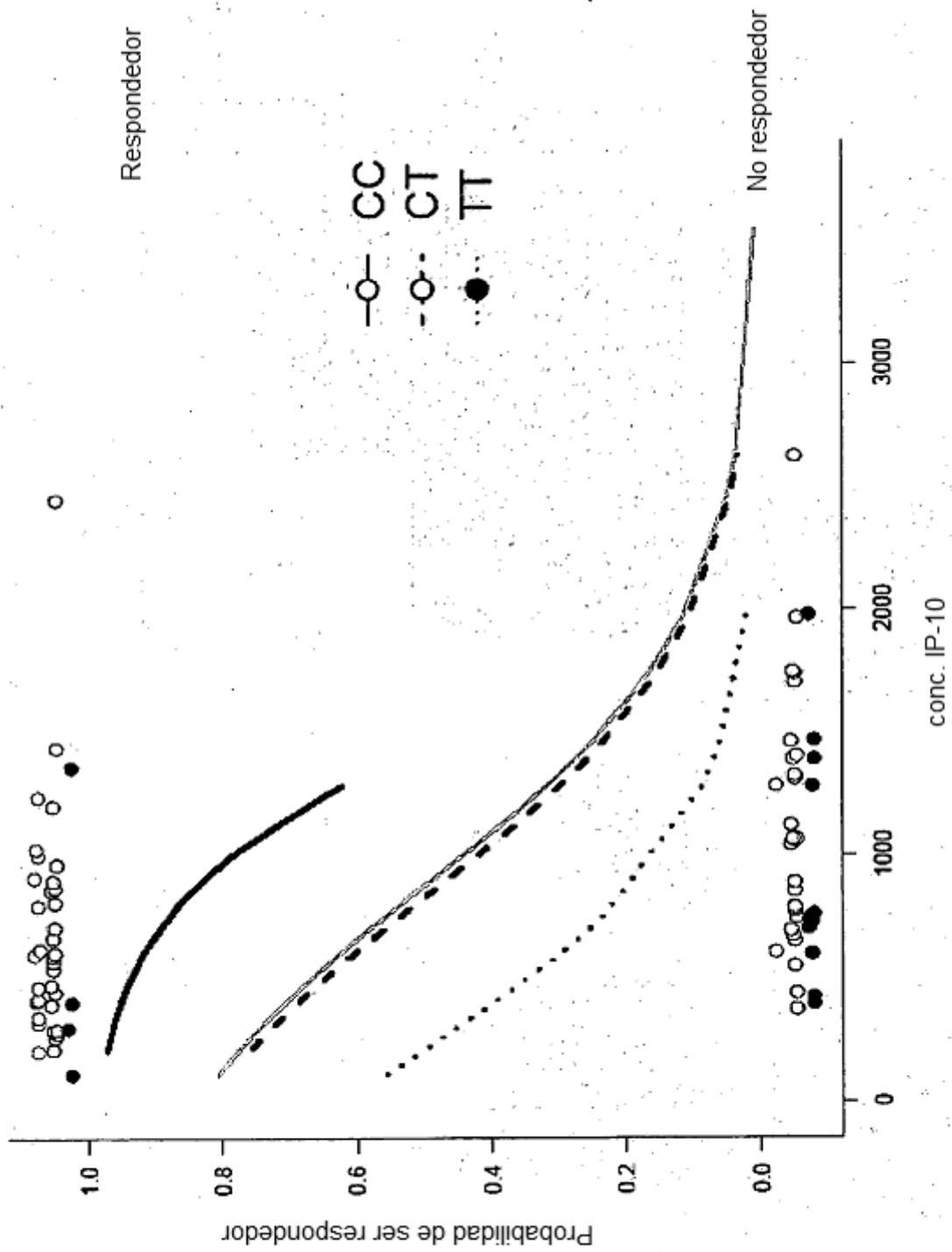


Figura 8

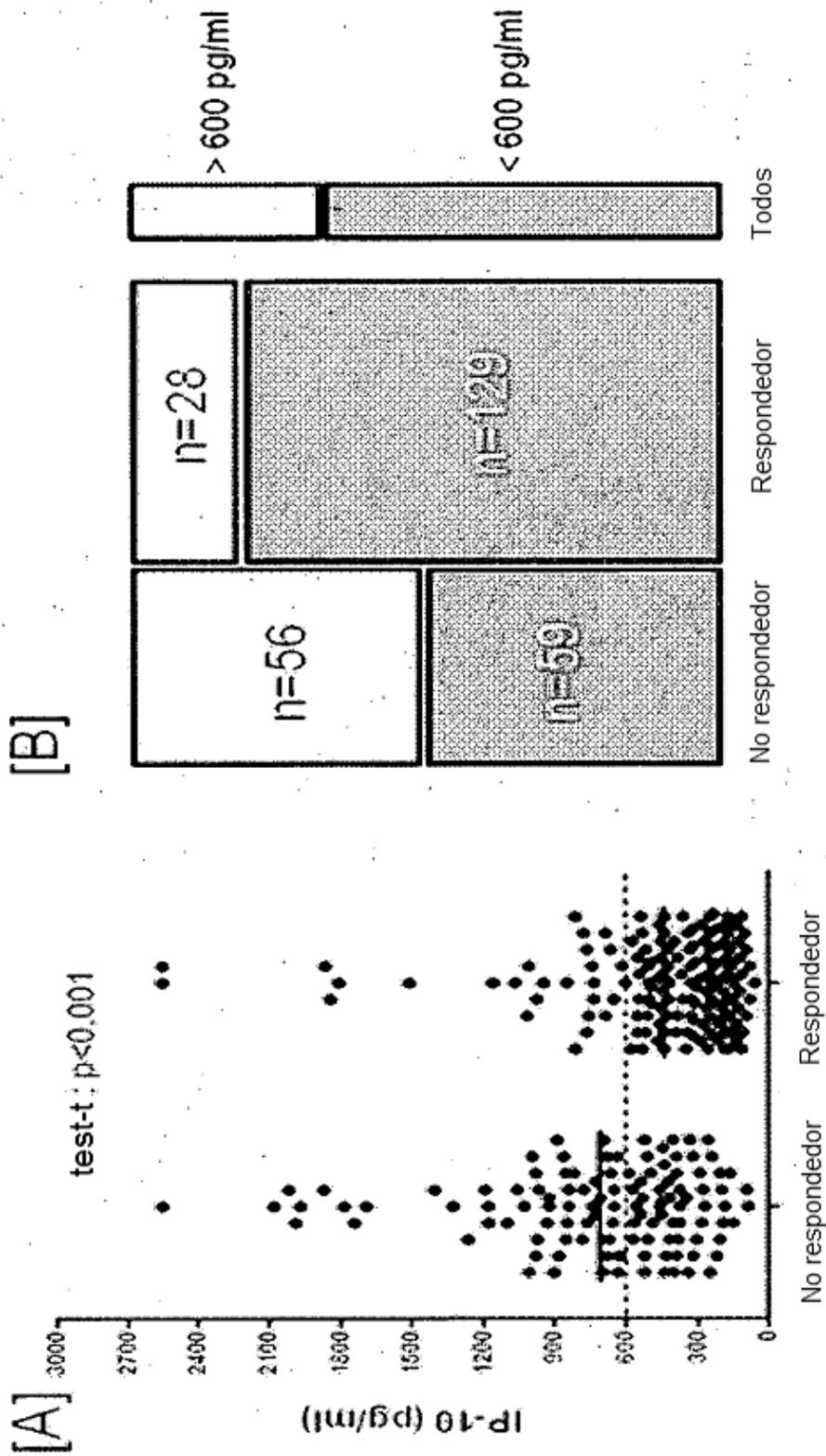


Figura 9

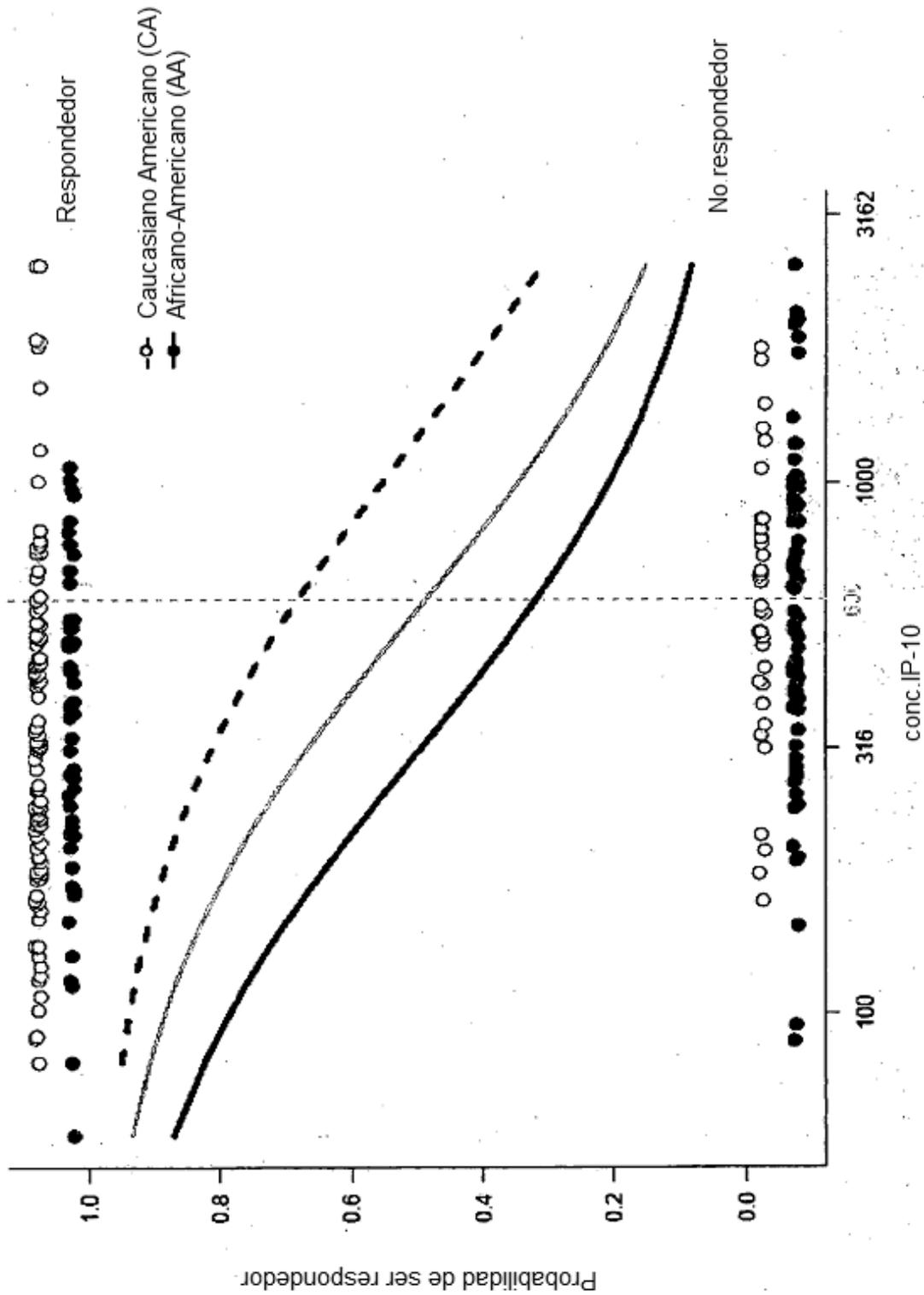


Figura 10

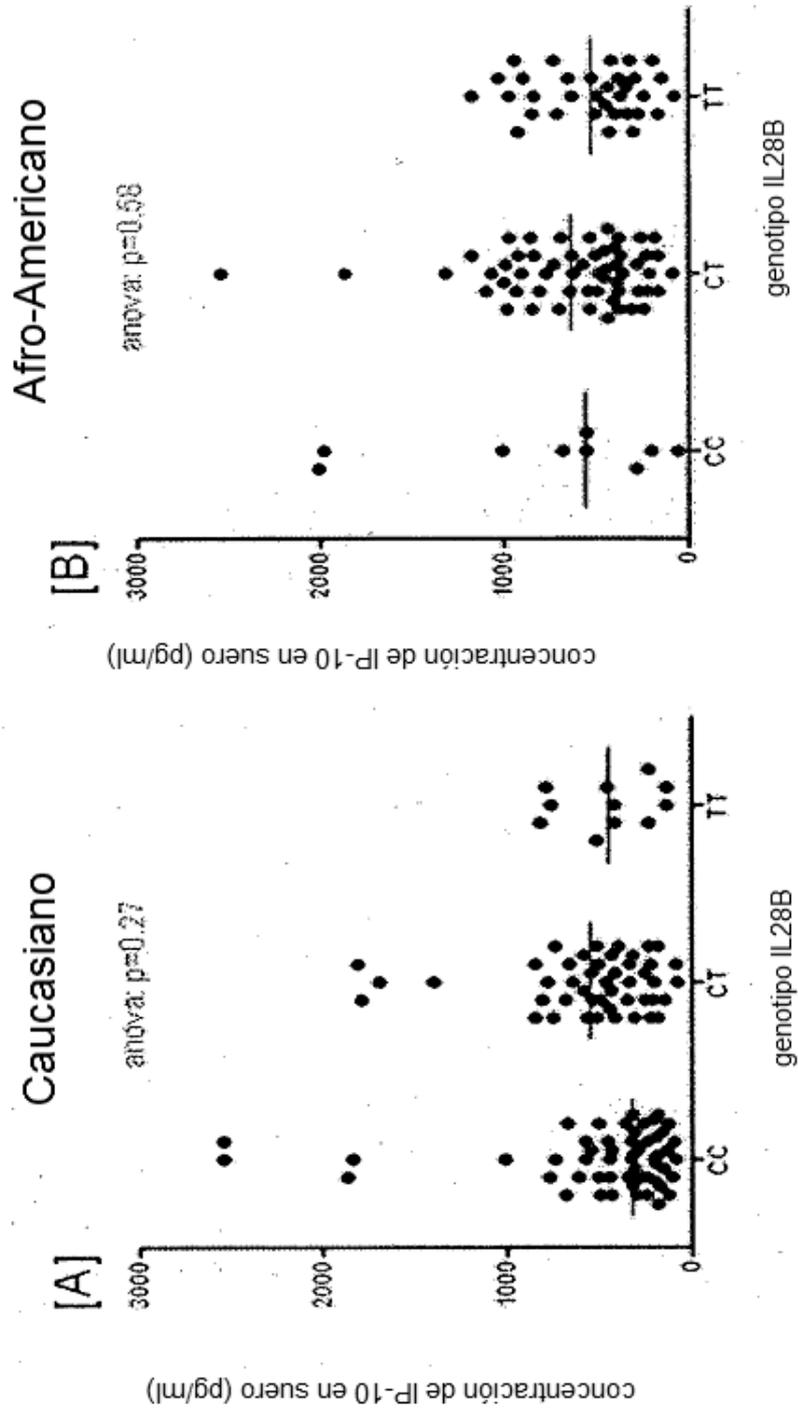


Figura 11

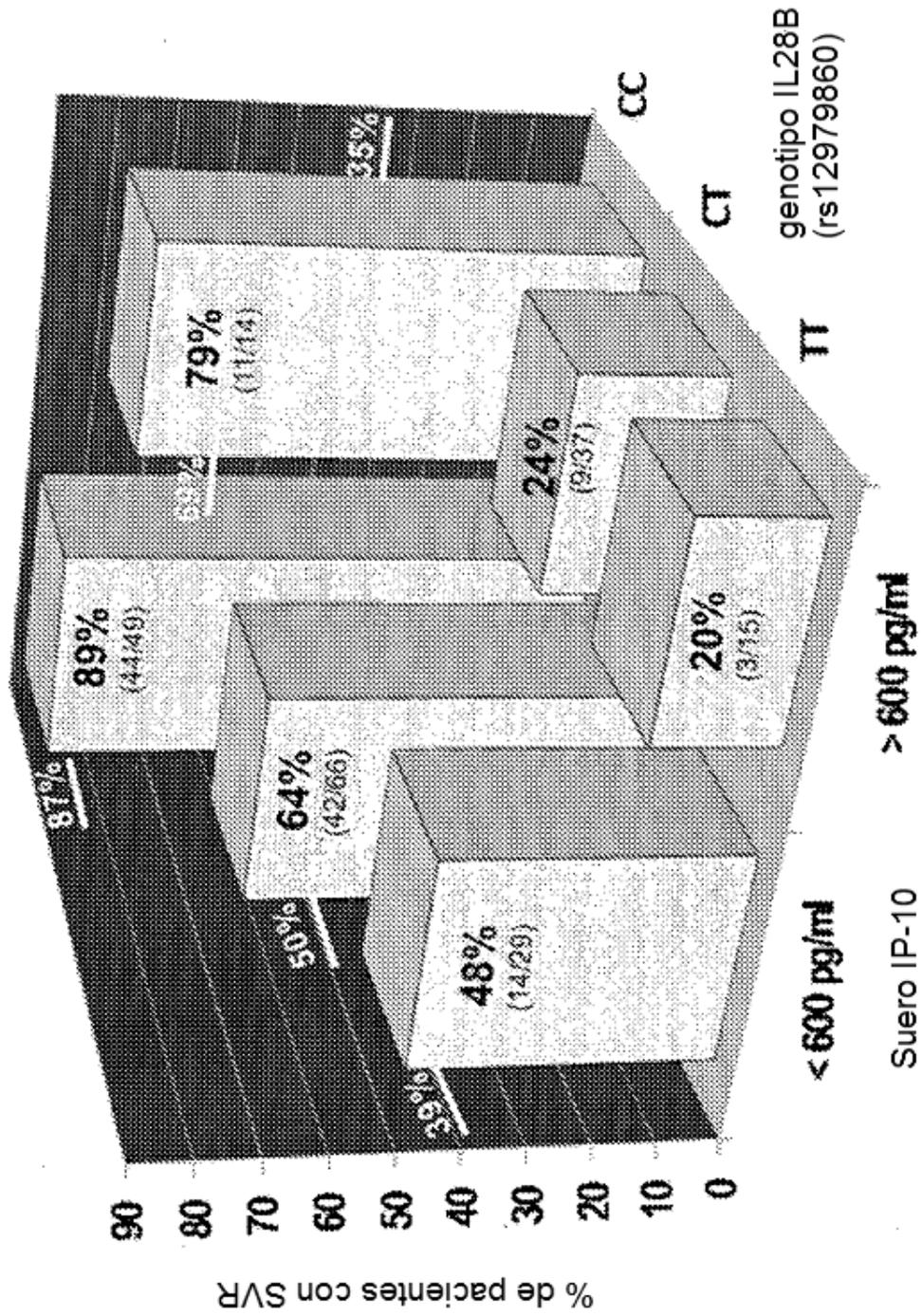


Figura 12

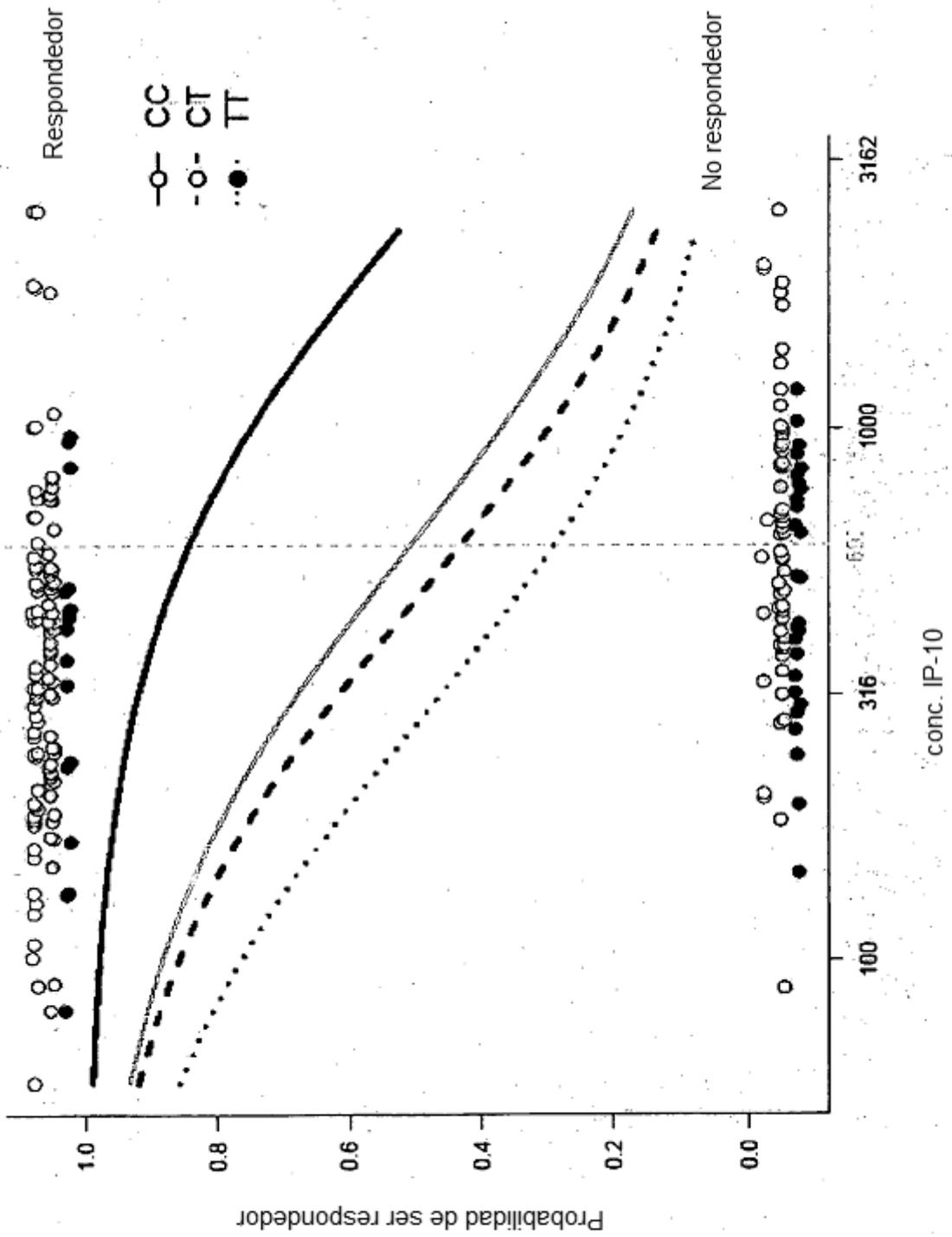


Figura 13

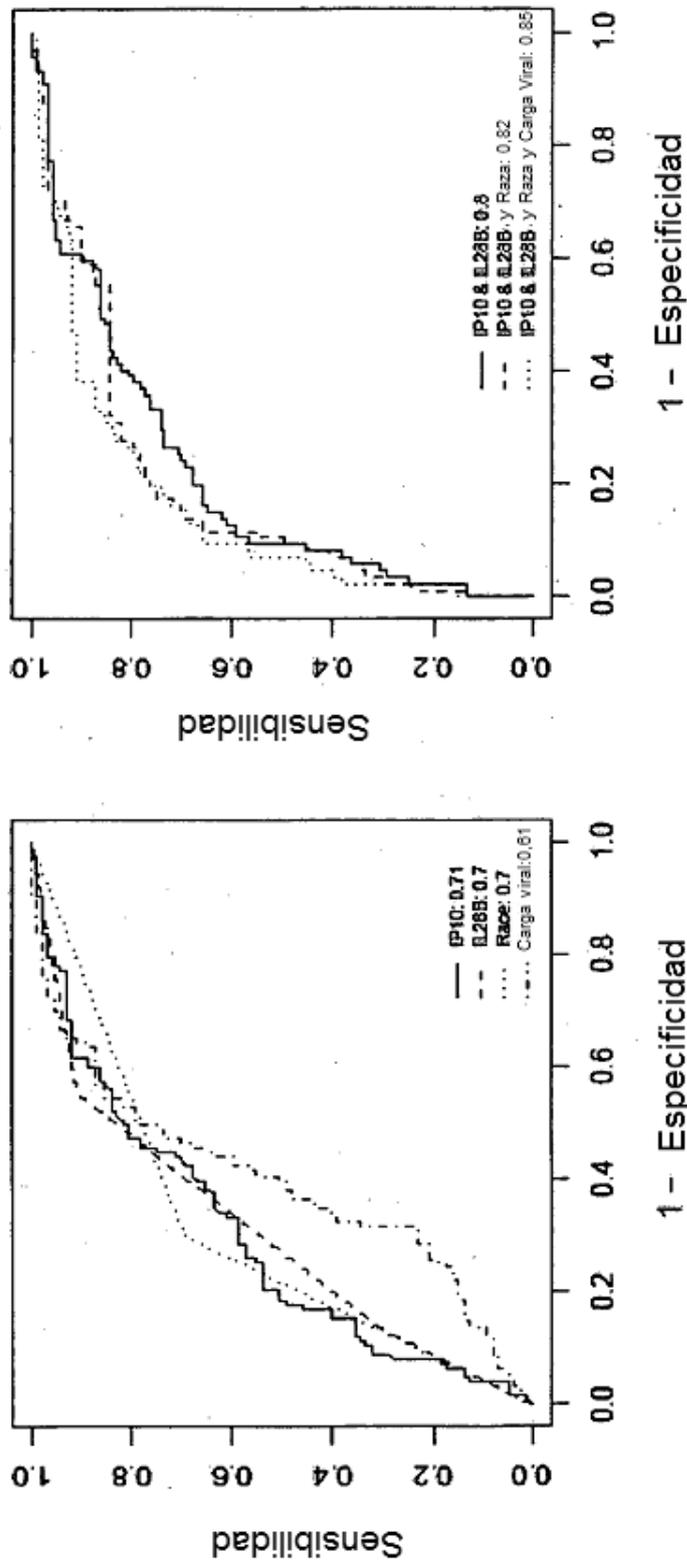


Figura 14

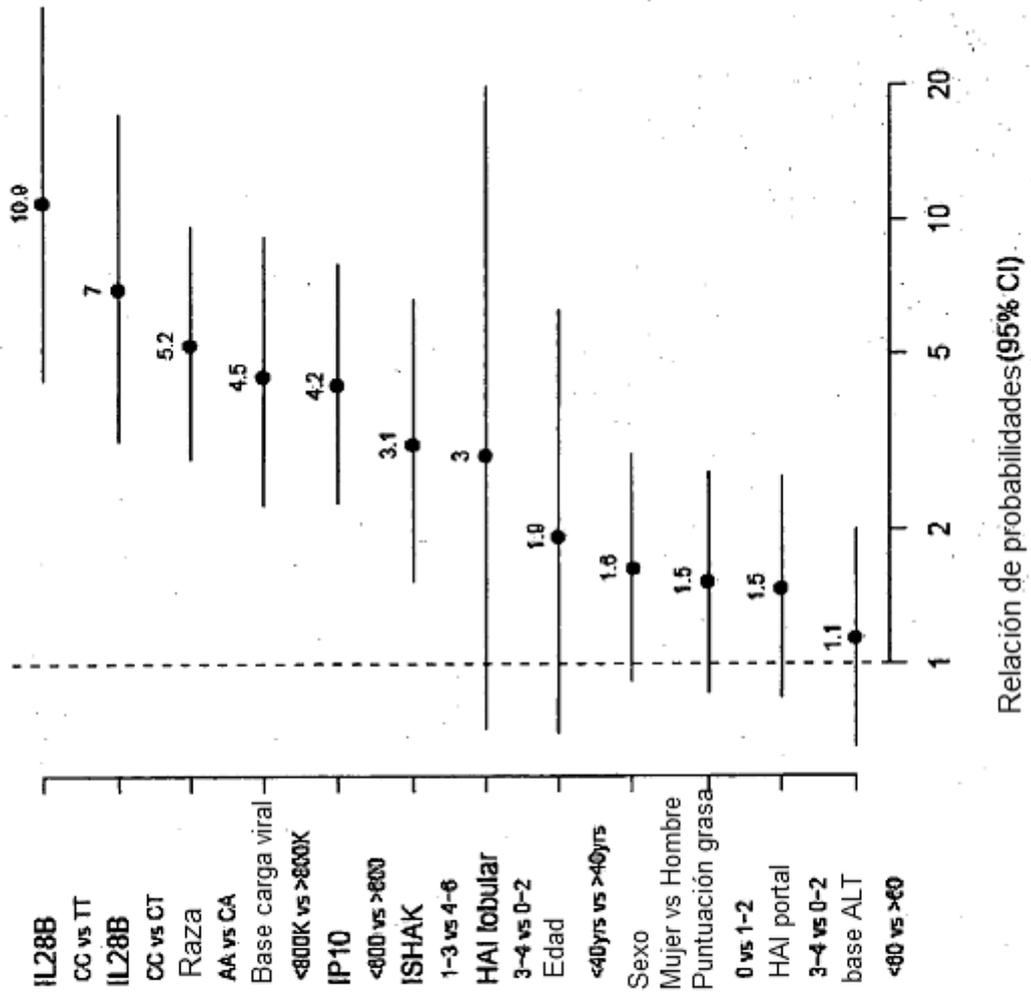


Figura 15