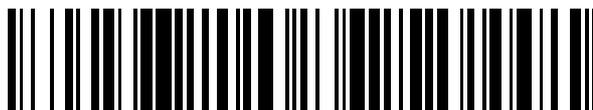


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 614**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

**G01N 33/576** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11817337 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2652509**

54 Título: **Procedimiento para predecir la respuesta a un tratamiento contra la hepatitis C**

30 Prioridad:

**15.12.2010 FR 1060568**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2016**

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE  
MONTPELLIER (50.0%)  
191, Avenue Doyen Gaston Giraud  
34000 Montpellier, FR y  
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1 (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEHMANN, SYLVAIN;  
ROCHE, STÉPHANE;  
DUCOS, JACQUES y  
TIERS, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 562 614 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**

Procedimiento para predecir la respuesta a un tratamiento contra la hepatitis C

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para predecir la eficacia de un tratamiento de la hepatitis C.

Estado de la técnica

10 Según el Boletín epidemiológico semanal del Instituto de vigilancia sanitaria de fecha 1 de julio de 2008, el número anual de defunciones asociadas al virus de la hepatitis C (VHC) en 2001 fue de 3.618 (respectivamente 6,1 defunciones por cada 100.000 habitantes). El número anual de defunciones imputables al VHC fue de 2.646 (4,5 por cada 100.000 habitantes). Un 95 % tenía cirrosis y un 33 % carcinoma hepatocelular. Esta mortalidad debería aumentar los años siguientes sabiendo que el gran aumento del número de cánceres primitivos de hígado en los países occidentales está ligado en gran parte al virus de la hepatitis C.

Actualmente, están disponibles tres tipos de terapias para curar la infección por VHC:

- el tratamiento por interferón, eficaz en aproximadamente un 20 % de las personas infectadas por VHC;
- 15 – la asociación interferón pegilado-ribavirina, eficaz en aproximadamente un 50 % de las personas infectadas por VHC;
- interferón elaborado por técnicas biológicas, eficaz en aproximadamente un 60 a 70 % de las personas infectadas por VHC.

20 Todos estos tratamientos, que se administran por inyección, tienen efectos indeseables tales como fiebre, dolores de cabeza, fatiga, náuseas y vómitos. Además, el tratamiento modifica la fórmula sanguínea.

25 En los pacientes aquejados de hepatitis C crónica, la asociación interferón pegilado-ribavirina conlleva una respuesta vírica prolongada en un 55 % de los casos. La obtención de una respuesta virológica prolongada es el objetivo principal del tratamiento de la hepatitis C crónica (aproximadamente un 60 a 80 % de los pacientes infectados por VHC). Está asociada a la desaparición de la actividad histológica y eventualmente de la fibrosis hepática, así como a una reducción del riesgo de carcinoma hepatocelular.

Los pacientes que no responden al tratamiento (45 %) pueden identificarse por la detección de la carga vírica lo mejor en el chequeo de la semana 12 hasta la suspensión del tratamiento (6 o 12 meses según el genotipo). La carga vírica presente en la semana 12 puede condicionar la suspensión terapéutica.

30 La falta de respuesta al tratamiento es un problema en particular para los pacientes infectados por el genotipo 1 del virus, que solo responden favorablemente en un 40-50 % de los casos con relación a los pacientes infectados por los genotipos 2 y 3, que tienen un 80-90 % de respuesta al tratamiento.

Un estudio reciente ha puesto en evidencia los factores que influyen en la respuesta al tratamiento como la edad, el genotipo vírico y el índice de masa corporal (Elefsiniotis *et al.*, 2008). Pero estos elementos no son lo bastante productivos como para dictar una elección terapéutica.

35 Al estudiar *in vitro* los mecanismos de resistencia al tratamiento de VHC, surge que diferentes proteínas víricas (E2, NS3/4A y NS5A) pueden desempeñar un papel en ellos (Hofmann *et al.*, 2005). En la mayoría de los estudios clínicos, no ha sido sin embargo posible ligar las variaciones de secuencia de estas proteínas con la respuesta al tratamiento (Wohnsland *et al.*, 2007). En paralelo, se han conducido enfoques genómicos globales (chip, SNP del inglés “single nucleotide polymorphism”, polimorfismo de nucleótido simple) para encontrar marcadores predictivos de respuesta al tratamiento. Se han sugerido ciertos polimorfismos del promotor de IL10 (Morgan *et al.*, 2008), pero es de hecho el marcador denominado IL28B (Ge *et al.*, 2009) el que parece tener interés actualmente en clínica. Se han identificado marcadores de la respuesta a un tratamiento basado en interferón en pacientes aquejados de hepatitis C crónica por espectrometría SELDI-TOF (Fujita *et al.*, 2011). Se ha identificado la apolipoproteína C-III como biomarcador plasmático potencial asociado a la resolución de la infección por VHC (Molina *et al.*, 2008). La solicitud WO 2006/107078 describe diferentes marcadores identificados como predictivos de una respuesta a un tratamiento por interferón en pacientes aquejados de VHC.

45 Existe sin embargo la necesidad de poder disponer de un marcador predictivo fiable de la respuesta al tratamiento basado en interferón, que es un tratamiento restrictivo y costoso. Dicho marcador, llamado “teragnóstico”, sería muy útil y permitiría añadir un elemento importante a la elección terapéutica ofrecida a pacientes infectados por el virus de la hepatitis C.

Descripción de las figuras

La figuras 1 y 2 representan la distribución del nivel de apo-C3 y, respectivamente, del nivel de ASH2, en pacientes que responden y no responden a un tratamiento basado en interferón.

La figura 3 representa el área bajo la curva de ASH2 y/o apo-C3 (para los pacientes que responden).

Descripción de la invención

5 Los inventores han descubierto, y es el fundamento de la invención, que hay una correlación entre la presencia de apolipoproteína CIII (de aquí en adelante apo-C3) y la del dímero de seroalbúmina sérica humana (de aquí en adelante ASH2) y la respuesta o falta de respuesta a una terapia basada en interferón en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C. Así, según un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para predecir la respuesta a un tratamiento basado en interferón en un paciente infectado por VHC, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de medida del nivel de apo-C3 en una muestra biológica de dicho paciente antes de cualquier tratamiento. Típicamente, la muestra biológica es una muestra de suero o plasma.

10 La respuesta al tratamiento basado en interferón puede tomar diferentes formas: (i) una mejora de la situación clínica durante y después del tratamiento, (ii) una mejora de la situación clínica durante el tratamiento pero una recaída después del tratamiento o (iii) ninguna mejora de la situación clínica durante o después del tratamiento. Los pacientes que apuntan a (i) se calificarán a continuación como pacientes “que responden” (R), mientras que los pacientes que apuntan a (ii) y (iii) se calificarán a continuación como pacientes “que no responden” (NR). La mejora de la situación clínica de un paciente se traduce en una disminución (estadísticamente) significativa de su carga vírica, que se mide mediante técnicas en sí conocidas.

15 Se entiende por “interferón” en el sentido de la presente invención el interferón  $\alpha$  ( $\alpha$ 2a o 2b) y sus formas pegiladas o no pegiladas, el interferón  $\beta$  ( $\beta$ 1a o 1b) así como el interferón  $\gamma$ . Según un modo de realización, el tratamiento basado en interferón es un tratamiento basado en interferón  $\alpha$  pegilado o no pegilado, eventualmente en asociación con ribavirina. Según otro modo de realización, el tratamiento basado en interferón es un tratamiento basado en interferón  $\beta$ .

20 Según un modo de realización, el procedimiento según la invención comprende además la comparación del nivel de apo-C3 medido con el nivel umbral de apo-C3, siendo un nivel de apo-C3 medido inferior o igual al nivel umbral predictivo de una respuesta al tratamiento basado en interferón.

25 La apo-C3 es un polipéptido de 8,8 kDa compuesto por una secuencia madura de 79 aminoácidos precedida de un péptido señal de 20 aminoácidos. La digestión enzimática por trombina en la coagulación que se desencadena en la preparación del suero (pero no de plasma) escinde la secuencia madura, generando un fragmento correspondiente a los ácidos 41-79 (COOH terminal) (Catapano *et al.* 1987). Este fragmento se detecta en las extracciones de suero, y su valoración corresponde por ello en este caso al nivel de apo-C3 sanguíneo.

30 El nivel umbral de apo-C3 se establece a partir de una población de pacientes infectados por VHC en que se ha extraído y analizado una muestra biológica antes del inicio del tratamiento basado en interferón y se han clasificado a continuación como pacientes que responden o no responden, típicamente mediante la detección de su carga vírica en el chequeo de la semana 12, como se indica anteriormente. El nivel umbral es el valor que permite repartir estadísticamente mejor la población estudiada entre el grupo R y el grupo NR usando una tecnología dada; es posible a continuación, para determinar la pertenencia al grupo R o NR de cualquier nuevo paciente, medir su nivel de apo-C3 usando la misma tecnología y comparar este nivel con el nivel umbral. Por supuesto, el nivel umbral de apo-C3 es susceptible de variar según la técnica y los aparatos usados para medir los niveles de apo-C3, y el especialista en la materia estará en condiciones de determinar este nivel umbral en función del material del que disponga.

35 Como puede advertirse por la lectura de la figura 1, existe un umbral estadísticamente significativo de apo-C3 por debajo del cual se puede predecir con una buena certidumbre (alta especificidad) que los pacientes infectados por VHC van a responder a un tratamiento basado en interferón.

40 Según otro modo de realización, que puede combinarse con el modo de realización precedente, el procedimiento según la invención comprende además la comparación del nivel de ASH2 medido con un nivel umbral de ASH2, siendo un nivel de ASH2 superior o igual al nivel umbral predictivo de una respuesta al tratamiento basado en interferón.

45 El nivel umbral de ASH2 se establece a partir de una población de pacientes infectados por VHC en que se ha extraído y analizado una muestra biológica antes del inicio del tratamiento basado en interferón y se han clasificado a continuación como pacientes que responden o no responden, típicamente mediante la detección de su carga vírica en el chequeo de la semana 12, como se indica anteriormente. El nivel umbral es el valor que permite repartir estadísticamente mejor la población estudiada entre el grupo R y el grupo NR usando una tecnología dada; es posible a continuación, para determinar la pertenencia al grupo R o NR de cualquier nuevo paciente, medir su nivel de ASH2 usando la misma tecnología y comparar este nivel con el nivel umbral. Por supuesto, el nivel umbral de ASH2 es susceptible de variar según la técnica y los aparatos usados para medir los niveles de ASH2, y el

especialista en la materia estará en condiciones de determinar este nivel umbral en función del material del que disponga.

5 Como puede advertirse por la lectura de la figura 2, existe un umbral estadísticamente significativo de ASH2 por encima del cual se puede predecir con una excelente especificidad (93,8 %) que los pacientes infectados por VHC van a responder a un tratamiento basado en interferón.

Es posible mejorar la sensibilidad del procedimiento de la invención midiendo conjuntamente los niveles de ASH2 y apo-C3. Como puede advertirse por la lectura de la figura 3, dicha medida conjunta permite detectar un 93,8 % de pacientes que responden al tratamiento con una buena especificidad (75 %).

10 Los niveles de apo-C3 y ASH2 pueden medirse mediante una técnica de espectrometría de masas llamada SELDI-TOF (del inglés "surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry", espectrometría de masas por desorción/ionización por láser potenciada por superficie/tiempo de vuelo). Esta técnica permite retener las proteínas sobre diferentes superficies cromatográficas y detectarlas con espectrometría de masas. Se puede obtener así rápidamente un perfil de expresión proteica que se va a analizar gracias a medios bioinformáticos. Se seleccionan los picos interesantes y se identifican las proteína correspondientes después de purificación bioquímica  
15 según técnicas bien conocidas por el especialista en la materia. Puede cuantificarse a continuación el nivel de las proteínas identificadas según técnicas igualmente bien conocidas por el especialista en la materia (tales como inmunodetección o espectrometría de masas cuantitativa).

Según otro modo de realización, el procedimiento según la invención comprende igualmente la medida de la expresión o del nivel de expresión de al menos uno de los marcadores siguientes:

- 20
- el marcador genético IL28B, en particular el polimorfismo rs12979860 CC y/o el polimorfismo rs8099917 TT de dicho marcador;
  - los genes enumerados en la tabla 4 de la solicitud de patente US 2005/028279, en particular aquellos elegidos del grupo que comprende ADAR, IFI27, IFI44, OAS3, MX1, MX2, PRKR, IFIT4, TRIM22, G1P2;
  - HCV-1 o HCV-4 (documento US 2010/0158866);
- 25
- los polinucleótidos de secuencia nº 1, nº 2, nº 3 o nº 4 de la solicitud WO 01/71007;
  - la proteína IP-10 (documento WO 2008/032210), igualmente conocida con la denominación CXCL10;
  - los genes elegidos del grupo que comprende KIR3DL3, KIR3DL2, KIR3DL1, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KLRG1, KIR3DS1, CD160, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-F, HLA-G, IFI27, TNFRSF17, IFI6, OAS2, ISG15, OAS3, IF1T1 (solicitud de patente WO 2010/076788).

30 Ventajosamente, el procedimiento según la invención comprende, además de la medida del nivel de apo-C3 y eventualmente de ASH2, la detección de los polimorfismos de IL28B y/o la medida del nivel de expresión de CXCL10.

35 El procedimiento según la invención permite por ello predecir la respuesta a un tratamiento basado en interferón en un paciente infectado por VHC a partir de una muestra biológica, típicamente una muestra de suero o plasma, extraída en el paciente antes de la implantación del tratamiento. Se comprende por ello que el diagnóstico de infección por VHC se ha planteado mediante pruebas clásicas (por ejemplo, midiendo la carga vírica, determinada por los niveles de ARN y/o el nivel de antígeno de cápsida) y que el procedimiento según la invención tiene como objetivo determinar si un tratamiento basado en interferón es apropiado, es decir, si un paciente es susceptible de sacar o no un beneficio de dicho tratamiento.

40 Gracias al procedimiento según la invención, se puede proponer a un paciente infectado por VHC, y en particular por el genotipo 1 del virus, un tratamiento alternativo basado en interferón en cuanto se ha determinado (por medios sencillos y fiables descritos anteriormente) que no responderá a dicho tratamiento basado en interferón. Dicho tratamiento alternativo puede comprender la administración de al menos un principio activo útil en el tratamiento de VHC, elegido especialmente entre los inhibidores de proteasa, inhibidores de polimerasa e inhibidores de NS5A.

45 Por otra parte, el hecho de que un paciente sea susceptible de responder o no a un tratamiento basado en interferón va a condicionar, a medio y largo plazo, la evolución de su enfermedad, lo que permitirá llegado el caso una mejor organización de la tramitación por los equipos médicos competentes.

El procedimiento de la invención puede aplicarse con la ayuda de un kit que comprende:

- 50
- patrones que permiten el establecimiento de una curva de referencia;
  - uno o varios reactivos específicos (anticuerpos, tampones, reactivos de revelado) necesarios para la realización de la valoración cuantitativa de apo-C3; y eventualmente

- instrucciones para aplicar la valoración cuantitativa de apo-C3 y/o ASH2.

Este kit puede comprender además uno o varios reactivos específicos (anticuerpos, tampones, reactivos de revelado) necesarios para la realización de la valoración cuantitativa de ASH2. El kit puede comprender además un reactivo específico necesario para la valoración de CXCL10.

5 La invención se ilustra por los ejemplos siguientes, dados a título indicativo.

**Ejemplo 1: Comprobación de la presencia del dímero de seroalbúmina humana y apolipoproteína CIII en pacientes infectados por VHC**

10 En el marco de un protocolo de investigación clínica del Centro hospitalario regional universitario de Montpellier validado éticamente (autorización del Comité de protección de personas en investigación biomédica- CPPRB), se efectuaron extracciones en los pacientes infectados por VHC (16 del genotipo 1, 3 del genotipo 2, 8 del genotipo 3 y 1 del genotipo 4, siendo desconocidos los demás genotipos) antes de la implantación de un tratamiento basado en interferón. Se analizaron las extracciones por espectrometría de masas SELDI.

Para comprobar los picos de interés, se depositaron las diferentes muestras en chips CM10 y Q10 a pH7. El protocolo era el siguiente:

- 15 a) preparación de las muestras: se pusieron 10 µl de suero en 15 µl de una solución de urea CHAPS y se agitó durante 15 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se diluyeron 7,5 µl de la mezcla en 300 µl del tampón (Tris 100 mM a pH 7 + 0,1 % de Triton);
- b) incubación de los chips: se pusieron los 2 chips (CM10 y Q10) en un bioprocesador. Se añadieron 150 µl de tampón (Tris a pH 7 + 0,1 % de Triton) sobre los puntos. Se incubó durante 5 minutos con agitación (500 rpm) y después se eliminó el tampón y se secó el bioprocesador sobre papel absorbente;
- 20 c) depósito de las muestras: se depositan las muestras diluidas sobre los puntos (8 muestras por chip);
- d) lavado: se lavaron los puntos dos veces durante 5 min con 150 µl de tampón Tris a pH7 + 0,1 % de Triton para quitar las proteínas no fijadas sobre la superficie bioquímica, y después una vez durante 5 min con 150 µl de tampón Tris a pH7 sin Triton con el fin de retirar el detergente. Se aclararon a continuación rápidamente los chips con 10 ml de HEPES 5 mM a pH7 para eliminar todas las sales y se dejaron secar durante 10 min;
- 25 e) análisis: se añadieron 2 x 0,8 µl de matriz SPA (y se dejó secar durante 10 min entre las 2 aplicaciones). Se realizó el análisis por SELDI-TOF con la ayuda de un espectrómetro de masas Protein Chip SELDI System PCS 4000 de la compañía Biorad. Se leyeron los chips a masa baja (3.500-20.000 Da) y masa alta (20.000-150.000 Da) según protocolos de lectura diferentes:
- 30 - masa alta (LMW): focalización en 10 kDa; energía del láser 2100 nJ y en un intervalo de masas de 0-200.000 Da, con un disparo de prueba ("warning shot") a 2300 y se lee ¼ del punto;
- masa alta (HMW): focalización en 130 kDa, energía del láser 2300 nJ y en un intervalo de masas de 0-200.000 Da, con un disparo de prueba ("warning shot") a 2500 y se lee ¼ del punto.

35 Después de pasar todas las muestras por el SELDI-TOF, se obtuvo un espectro para cada muestra.

Se realizó el análisis principalmente gracias al software Protein chip Data manager. Antes de analizar los espectros, es necesario previamente:

- alinear los diferentes espectros;
- calcular el ruido de fondo medio en el intervalo de masas elegido;
- 40 - ajustar lo mejor posible el valor de referencia antes de restar al espectro;
- normalizar las intensidades de los espectros a la corriente de ión total (TIC).

Se realizó una primera serie de análisis en 32 extracciones que permiten seleccionar varios picos de SELDI de interés (por diferencia estadística entre el grupo R y NR basada en una prueba de Student y una prueba de Mann-Whitney con  $p < 0,05$  como mínimo). Una validación que usa 16 nuevas extracciones permitió confirmar el interés de ciertos picos (por prueba de Student y de Mann-Whitney y calculando la sensibilidad y especificidad obtenidas tomando en consideración dos picos para clasificar la población) y finalmente seleccionar 5 de ellos.

Entre estos 5 picos, uno de ellos llamado p10 se identificó por espectrometría de masas después de purificación bioquímica. El segundo de estos picos, llamado p4, se identificó igualmente por espectrometría de masas después de purificación bioquímica.

La purificación de los marcadores p10 y p4 pudo efectuarse reproduciendo en volúmenes de suero muy altos, en columnas de “espín”, las condiciones de captura de SELDI. Se analizaron las fracciones obtenidas en SELDI para verificar la presencia del marcador de interés, y después se cargaron en un gel de electroforesis. Después de la coloración del gel, se escindió la zona donde se esperaba el marcador debido a su peso molecular (PM). Se efectuó una última verificación de la presencia del marcador eluido del gel antes de obtener su secuencia por análisis de CL-EM/EM.

En lo referente a p10, pudo identificarse seroalbúmina humana (ASH). Sabiendo que la albúmina tiene un PM de 66 kDa y que p10 tiene un PM de 132 kDa, puede concluirse que p10 corresponde a un dímero de ASH. p4 a su vez corresponde a una forma truncada de la apolipoproteína CIII. Para este último marcador, los péptidos secuenciados eran los siguientes:

DALSSVQESQVAQQAR (SEQ ID N°:1)

FSEFWDLDPVRPTSAVAA (SEQ ID N°:2)

GWVTDGFSSLK (SEQ ID N°:3)

DKFSEFWDLDPVRPTSAVAA (SEQ ID N°:4)

Se ilustra a continuación el alineamiento de estos péptidos sobre la secuencia de apo-C3, precedida de su péptido señal:

MQPRVLLVVA LLALLASARA SEAEDASLLS FMQGYMKHAT KTAKDALSSV  
QESQVAQQAR GWVTDGFSSL KDYWSTVKDK FSEFWDLDP VRPASAVAA  
 (SEQ ID N°:5)

La parte secuenciada corresponde por ello al fragmento 41-79 de apo-C3, que se encuentra en las extracciones de suero a consecuencia de la escisión con trombina en la coagulación (Catapano *et al.* 1987).

#### **Ejemplo 2: Correlación entre la presencia de marcadores de interés y la respuesta o falta de respuesta al tratamiento basado en interferón**

Los pacientes mencionados en el ejemplo 1 se trataron con interferón  $\alpha$  pegilado + ribavirina. Se realizó un seguimiento de los pacientes 12 semanas después del inicio del tratamiento, fecha en la que se efectuaron nuevas extracciones con el fin de determinar

- por una parte los pacientes que responden (R) y los pacientes que no responden (NR) al tratamiento; y
- por otra parte, para cada categoría de pacientes, si existe una correlación (estadísticamente significativa) entre los niveles de ASH2 y/o apo-C3 determinados antes de la implantación del tratamiento y la respuesta o falta de respuesta a dicho tratamiento.

Como puede advertirse con la lectura de la tabla 1 y de la figura 1, existe una diferente estadísticamente significativa del nivel de apo-C3 (determinado antes de la implantación del tratamiento) entre los pacientes que responden y no responden al tratamiento ( $p < 0,05$  en la prueba de t y  $p < 0,05$  en la prueba de Kruskal-Wallis). Un nivel de apo-C3 inferior al umbral de 2,9 en unidades arbitrarias permite detectar un 100 % de pacientes que responden con una especificidad del 43,8 % (véase la tabla 2), es decir que no se detecta ningún paciente que no responda por encima de este umbral.

Igualmente, puede advertirse con la lectura de la tabla 1 y de la figura 1 que existe una diferencia estadísticamente significativa del nivel de ASH2 (determinado antes de la implantación del tratamiento) y entre los pacientes que responden y no responden al tratamiento ( $p < 0,01$  en la prueba de t y  $p < 0,006$  en la prueba de Kruskal-Wallis). Un nivel de ASH2 inferior al umbral de 1,9 en unidades arbitrarias permite detectar un 62,5 % de pacientes que responden con una excelente especificidad del 93,8 % (véase la tabla 2), es decir con muy pocos falsos positivos por encima de este umbral.

Por último, una combinación de estos dos marcadores tomando como criterio los umbrales para estos dos parámetros permite mejorar más los resultados de detección con un área ROC de 0,91 (véanse la tabla 2 y la figura 3).

Tabla 1: Valores de apo-C3 y ASH2 medidos para pacientes R y NR

Grupo	Apo-C3	ASH2	Grupo	Apo-C3	ASH2
R	1,35	1,46	NR	2,66	1,81
R	2,57	2,15	NR	2,72	1,67
R	2,75	2,49	NR	3,46	1,84
R	2,15	2,00	NR	3,04	1,95
R	2,90	1,71	NR	3,77	1,90
R	2,59	2,42	NR	3,10	1,98
R	1,94	2,03	NR	3,05	2,00
R	1,65	1,77	NR	4,36	1,61
R	2,26	1,91	NR	1,47	1,11
R	1,01	1,93	NR	1,40	1,38
R	1,52	2,21	NR	1,69	1,76
R	2,71	2,57	NR	2,48	1,65
R	1,24	1,23	NR	2,92	1,59
R	1,30	2,20	NR	1,41	1,85
R	1,05	2,00	NR	1,04	1,65
R	1,57	2,04	NR	1,68	1,91

Tabla 2

Pico	Sensibilidad	Especificidad	ROC
Apo-C3	100	43,8	0,72
ASH2	62,5	93,8	0,79
Apo-C3 + ASH2	93,8	75	0,91

5 **Referencias bibliográficas**

Catapano AL. (1987) "Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein C-II is modulated by the COOH terminal region of apolipoprotein C-III". *Chem. Phys. Lipids*. 1987 Oct; 45(1):39-47

Elefsiniotis, I. S., Pavlidis, C, Ketikoglou, I., Koutsounas, S., Scarmeas, N., Pantazis, K. D., Moulakakis, A. y Tsianos, E. V. (2008). "Patient's age modifies the impact of the proposed predictors of sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with PEG-interferon plus ribavirin". *Eur. J. Intern. Med.* 19, 266-270.

Hofmann, W. P., Dries, V., Herrmann, E., Gartner, B., Zeuzem, S. y Sarrazin, C. (2005). "Comparison of transcription mediated amplification (TMA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue". *J. Clin. Virol.* 32, 289-293.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, *et al.* (2009) "Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance". *Nature* 2009; 461: 399-401.

Morgan, T. R., Lambrecht, R. W., Bonkovsky, H. L., Chung, R. T., Naishadham, D., Sterling, R. K., Fontana, R. J., Lee, W. M., Ghany, M. G., Wright, E. C. y O'Brien, T. R. (2008). "DNA polymorphisms and response to treatment in patients with chronic hepatitis C: results from the HALT-C trial". *J. Hepatol.* 49, 548-556.

Wohnsland, A., Hofmann, W. P. y Sarrazin, C. (2007). "Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C". *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 23-38.

Fujita, N., Nakanishi, M., Mukai, J., Naito, V., Ichida, T., Kaito, M., Yoshikawa, T. y Takei, V. (2011). "Identification of treatment efficacy-related host factors in chronic hepatitis C by proteinchip serum analysis". *Mol. Med.* 17(1-2), 70-78.

Molina, S., Missé, D., Roche, S., Badiou, S., Cristol, JP., Bonfils, C., Dierick, JF., Veas, F., Levayer, T., Bonnefont-Rousselot, D., Maurel, P., Coste, J. y Fournier-Wirth, C. (2008). "Identification of apolipoprotein C6III as a potential plasmatic biomarker associated with the resolution of hepatitis C virus infection". *Proteomics Clin. Appl.* 2, 751-761.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> CENTRO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE MONTPELLIER  
 <120> Procedimiento para predecir la respuesta a un tratamiento contra la hepatitis C  
 5 <130> 1H265100 0003 WO/MN  
 <150> FR1060568  
 <151> 15-12-2010  
 <160> 5  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 10 <210> 1  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 1

**Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg**  
**1 5 10 15**

15 <210> 2  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 20 <400> 2

**Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala**  
**1 5 10 15**

25 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

**Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys**  
**1 5 10**

30 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

Asp Lys Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr  
 1 5 10 15

Ser Ala Val Ala Ala  
 20

<210> 5

<211> 99

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)...(20)

10 <400> 5

Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met  
 20 25 30

Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser  
 35 40 45

Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr  
 50 55 60

Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys  
 65 70 75 80

Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Ala Ser Ala  
 85 90 95

Val Ala Ala

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para predecir la respuesta a un tratamiento basado en interferón en un paciente infectado por el virus de la hepatitis C (VHC), comprendiendo dicho procedimiento una etapa de medida del nivel de apo-C3 en una muestra biológica de dicho paciente previamente a cualquier tratamiento.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende una etapa de medida del nivel de ASH2.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se mide el nivel de apo-C3 y se compara este nivel con un nivel umbral de apo-C3, siendo un nivel de apo-C3 medido inferior o igual al nivel umbral predictivo de una respuesta al tratamiento basado en interferón.
- 10 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 3, en el que se mide el nivel de ASH2 y se compara este nivel de ASH2 con el nivel umbral de ASH2, siendo un nivel de ASH2 medido superior o igual al nivel umbral predictivo de una respuesta al tratamiento basado en interferón.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente está infectado por el genotipo 1 de VHC.
- 15 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tratamiento basado en interferón es un tratamiento por interferón  $\alpha$  pegilado o no pegilado, por interferón  $\beta$  o por interferón  $\gamma$ .
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el tratamiento basado en interferón es un tratamiento por interferón  $\alpha$  pegilado o no pegilado.
- 20 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el interferón  $\alpha$  pegilado o no pegilado se usa en asociación con ribavirina.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra biológica es una muestra de suero o de plasma.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la detección de los polimorfismos de IL28B y/o la medida del nivel de expresión de CXCL10.

25

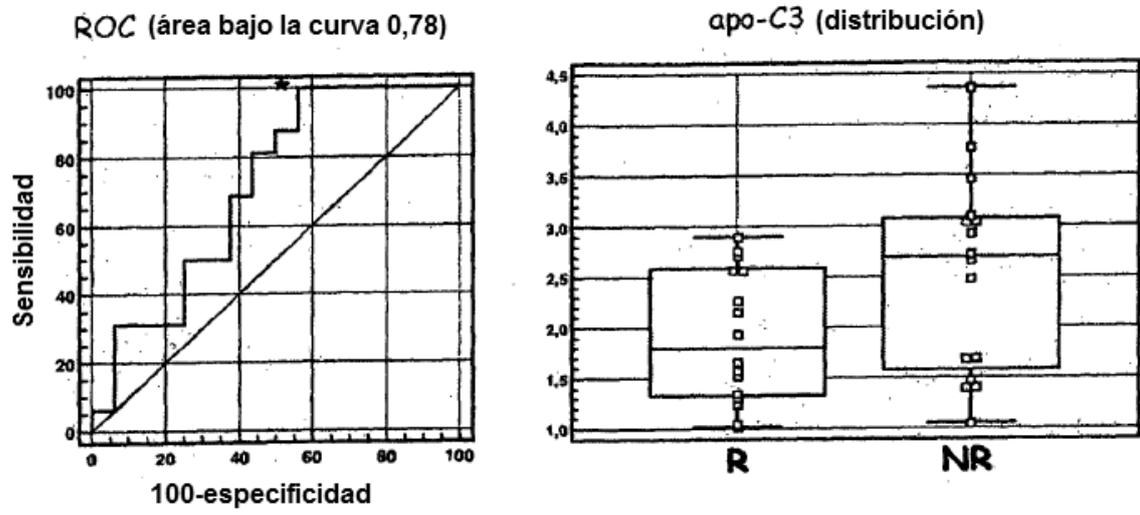


FIG.1

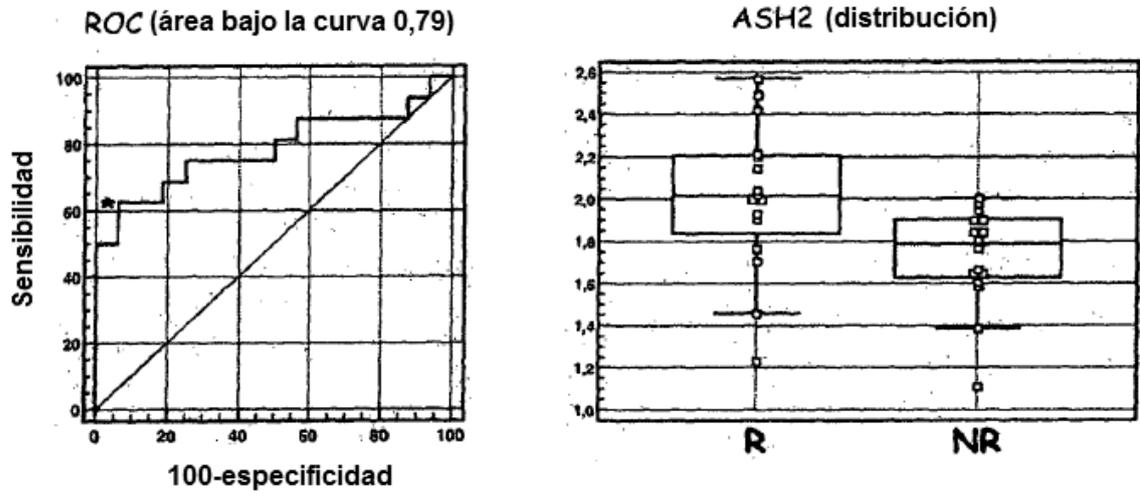
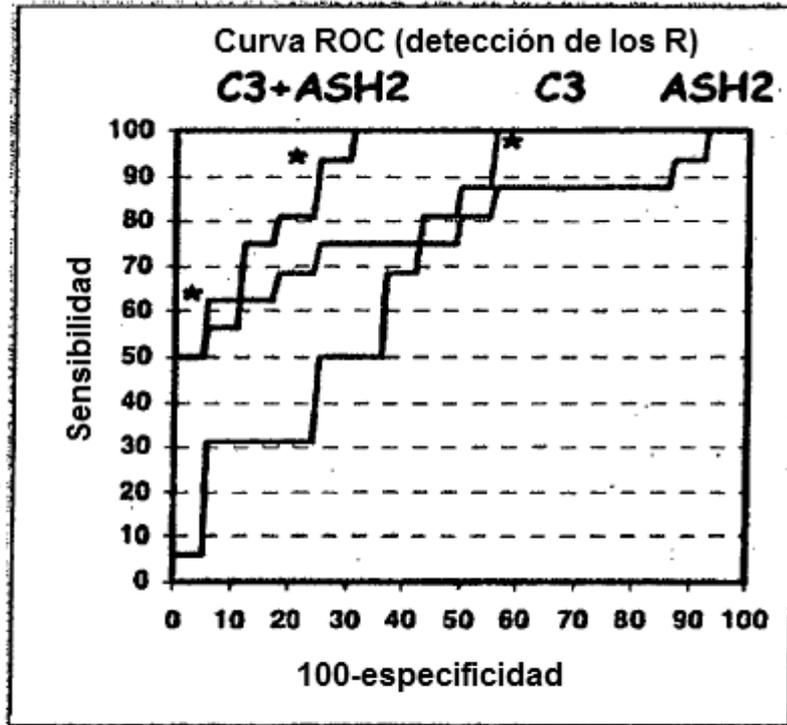


FIG.2



**FIG.3**