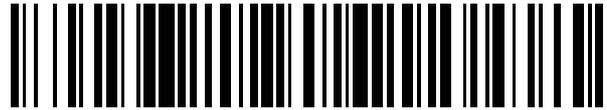


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 266**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2013 PCT/NL2013/050204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13141705**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2013 E 13712387 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2828401**

54 Título: **Medios y procedimientos para la predicción de respuesta al tratamiento de la hepatitis B**

30 Prioridad:

19.03.2012 EP 12160199
26.09.2012 EP 12186188

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2018

73 Titular/es:

ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM (100.0%)
Meibergdreef 9
1105 AZ Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

REESINK, HENDRIK, WILLEM;
JANSEN, LOUIS y
KOOTSTRA, NEELTJE, AKKE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 657 266 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

Medios y procedimientos para la predicción de respuesta al tratamiento de la hepatitis B

La invención se refiere a los campos de la biología, la virología y la medicina. En particular, la invención se refiere al tratamiento de la hepatitis B.

5 La hepatitis B es una enfermedad infecciosa inflamatoria del hígado causada por el virus de la hepatitis B (HBV). El virus se transmite principalmente por exposición a fluidos corporales, a través del contacto sexual, transfusiones de sangre, diálisis renal, uso compartido de agujas por personas adictas a las drogas, infección perinatal, etcétera.

10 El HBV es un miembro de la familia Hepadnavirus. El virus es uno de los más pequeños con envoltura, con un diámetro de aproximadamente 42 nm. La partícula del virus (virión) consiste en una envoltura lipídica externa (que contiene principalmente antígeno de superficie de la hepatitis B, HBsAg) y un núcleo nucleocápside icosaédrica compuesto por el antígeno del núcleo de la hepatitis B (HBcAg). La nucleocápside encierra el ADN viral y una ADN polimerasa que tiene actividad de transcriptasa inversa. La envoltura externa contiene proteínas integradas que están involucradas en la unión viral y la entrada en células susceptibles.

15 La infección aguda por HBV se caracteriza por inflamación del hígado, vómitos e ictericia. Por lo general, los síntomas duran unas semanas y luego mejoran gradualmente mientras el sistema inmunitario elimina la infección. La probabilidad de recuperación total y establecimiento de inmunidad protectora aumenta con la edad: mientras que solo el 5% de los adultos sufrirá una infección persistente que durará más de seis meses, esto es, la infección crónica por HBV, esta tasa aumentará al 70% para los niños pequeños, y 95% para recién nacidos infectados perinatalmente.

20 La inflamación hepática prolongada causada por infección con HBV puede dar como resultado la hepatitis B crónica (CHB) con progresión a fibrosis hepática, cirrosis y finalmente carcinoma hepatocelular (HCC) y muerte. Esta es la razón por la cual el HBV ha sido clasificado como un carcinógeno de clase I, esto es, un agente carcinógeno para los humanos, por WHO's International Agency for the Research on Cancer (IARC). Por ejemplo, las directrices actuales de la American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) recomiendan el tratamiento para pacientes que presentan niveles de ADN de HBV en suero por encima de 2,000 UI/mL y/o con niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT) (> 2 veces el límite superior de la normalidad).

25 CHB se puede dividir en cuatro fases. En las personas que están infectadas perinatalmente, una fase de tolerancia inmunitaria ocurre con mayor frecuencia. Esta fase se caracteriza por la detección del "antígeno e" de la hepatitis B (HBeAg). Los anticuerpos anti-HBe no son detectables durante esta fase. Los niveles plasmáticos de ADN del HBV están por encima de 20,000 UI/mL y, a menudo, son mucho más altos.

30 Una segunda fase es la fase inmunoactiva. Durante esta fase, los valores de ALT aumentan y algunos pacientes pueden perder HBeAg y convertirse en anticuerpos anti-HBe. Después de la seroconversión de HBeAg/antiHBe, la cantidad de ADN plasmático del HBV generalmente disminuye por debajo de 20,000 UI/mL. Esta fase se denomina fase de hepatitis B inactiva crónica negativa de HBeAg. Posteriormente se puede desarrollar una fase de hepatitis B crónica activa negativa de HBeAg, debido al desarrollo de mutantes de prenúcleo de HBV; los niveles plasmáticos de ADN del HBV están nuevamente por encima de 20,000 UI/mL y los valores de ALT se incrementan (R.B. Takkenberg, thesis University of Amsterdam (2011), The Netherlands, chapter 2, ISBN 9789090263045).

40 En todo el mundo, alrededor de 400 millones de personas tienen hepatitis B crónica, y aproximadamente 650,000 personas mueren por complicaciones relacionadas con la HBV cada año. La hepatitis B crónica (CHB) es un proceso dinámico y, como se describió anteriormente, puede estar presente como fases inactivas y activas. Los esquemas de tratamiento típicos incluyen análogos de interferón alfa o nucleótidos/nucleósidos que inhiben la ADN polimerasa viral. En los estudios se utilizó terapia de combinación con análogos de nucleósidos/nucleótidos con interferón alfa. Una mejora importante fue la introducción de interferón pegilado (por ejemplo, Pegasys®), que proporciona una semivida prolongada de interferón, en la terapia. Para una revisión de la epidemiología y la terapia de la infección por VHB, véase J.L. Dienstag N Engl J Med 2008, 359; 1486-1500.

45 A pesar de la terapia mejorada, todavía solo una parte muy pequeña de pacientes eliminará la infección (pérdida de HBsAg y ADN de HBV con o sin desarrollo de anticuerpos anti-HBs) bajo tratamiento, mientras que la mayoría de los otros no lo hará. Sería, de este modo, deseable poder predecir la respuesta de un paciente a la terapia de HBV, con el fin de ajustar una estrategia de tratamiento desde el principio.

50 Se ha demostrado en muchos estudios que la incapacidad para lograr la depuración inmune viral, con altos niveles persistentes de viremia del HBV, se asocia con resultados clínicos pobres, que incluyen cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. La evidencia demuestra que las personas que eliminan la infección por el HBV tienen un riesgo bajo de estos resultados adversos. Sin embargo, una cantidad considerable de pacientes no logran la depuración viral después de la terapia y, especialmente con el interferón, los efectos secundarios son comunes. Se han descrito varios marcadores favorables para la depuración viral en CHB (por ejemplo, genotipo viral A y B, seroconversión temprana de HBeAg, HBsAg de referencia inferior). Sin embargo, considerando la eficacia subóptima de las terapias disponibles, es

de gran valor práctico establecer más (y preferiblemente más fuertes) predictores de respuesta (o no respuesta) antes de comenzar el tratamiento antiviral.

Es un objeto de la presente invención proporcionar marcadores adicionales para un resultado positivo o negativo del tratamiento de HBV.

5 La presente invención proporciona la visión de que el resultado del tratamiento de la hepatitis B se correlaciona con polimorfismos de nucleótidos, tanto en el genoma del individuo infectado como en el genoma de HBV, y con el nivel de expresión de carnitina y los derivados de carnitina en dicho individuo. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del genoma humano asociado con el resultado del tratamiento del HBV se representan en la figura 1, mientras que los SNP del genoma del HBV asociados con el resultado del tratamiento del HBV se representan en la figura 2. La nomenclatura de las posiciones de los nucleótidos se usó según Galibert et al. (Galibert F, et al. Nature. 1979 Oct 25;281(5733):646-50.). Hasta la presente invención, no se sabía que existieran correlaciones entre los polimorfismos de nucleótidos genómicos + HBV y el resultado del tratamiento con HBV. También se desconocía que los niveles de expresión de carnitina y los derivados de carnitina son indicativos del resultado del tratamiento del HBV. Ahora que la presente invención ha proporcionado la visión de que los polimorfismos de nucleótidos están asociados con el resultado del tratamiento, ha sido posible tipificar una muestra que contiene ácido nucleico de un individuo determinando al menos uno de los polimorfismos representados en la figura 1 y/o 2. Se describe un procedimiento para la tipificación de una muestra que contiene ácido nucleico de un paciente con hepatitis B, que comprende determinar un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 en ácido nucleico de dicha muestra. Los procedimientos para detectar polimorfismos de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica y, por ejemplo, implican la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, por ejemplo, usando técnicas comunes como PCR, MLPA, secuenciación, etc. Tales procedimientos bien conocidos no necesitan más explicación.

También ha sido posible tipificar una muestra de un paciente con hepatitis B determinando el nivel de expresión de carnitina y/o un derivado de carnitina en dicha muestra. Un nivel relativamente bajo de carnitina y/o un derivado de carnitina es indicativo de un resultado de tratamiento de hepatitis B positivo, como se describe con más detalle a continuación en este documento. Se describe un procedimiento para la tipificación de una muestra de un paciente con hepatitis B, que comprende determinar el nivel de expresión de carnitina y/o de un derivado de carnitina en dicha muestra. Preferiblemente, el procedimiento comprende determinar el nivel de carnitina y/o de un derivado de carnitina en dicha muestra.

30 La carnitina es un compuesto de amonio cuaternario biosintetizado a partir de los aminoácidos lisina y metionina. La carnitina está implicada en el metabolismo de los ácidos grasos, ya que transporta los grupos acilo de cadena larga de los ácidos grasos a la matriz mitocondrial. Un derivado de carnitina se define en este documento como un compuesto basado en carnitina distinto de la carnitina en sí misma, que contiene una unidad estructural carnitina, opcionalmente con modificaciones, sustituciones, grupos añadidos y/o deleciones, que todavía tiene al menos una propiedad de metabolismo de ácido graso de la carnitina. Los derivados de carnitina preferidos son acetil-L-carnitina y propionil-L-carnitina. Como se usa en este documento, el término "carnitina" abarca L-carnitina y D-carnitina. Sin embargo, se prefiere la L-carnitina.

Los procedimientos descritos en este documento son particularmente apropiados para determinar si un determinado paciente con hepatitis B es susceptible al tratamiento de la hepatitis B. Como se usa en este documento, un paciente con hepatitis B es "susceptible al tratamiento de hepatitis B" si el paciente tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B. Un paciente con un resultado de tratamiento positivo se llama respondedor. Por otro lado, si un paciente no muestra un resultado positivo del tratamiento, tal paciente se denomina no respondedor. La invención proporciona un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con hepatitis B comprende el alelo G del SNP rs12356193. Los procedimientos según la invención son capaces de determinar si un paciente de HBV dado es probable que responda a la terapia de HBV, antes del inicio de tal terapia. Esto proporciona la ventaja de que los pacientes que probablemente no respondan pueden ser excluidos de la terapia, evitando así costos innecesarios, carga de tratamiento y efectos secundarios. Por otro lado, se puede decidir más fácilmente ofrecer a los pacientes con una alta probabilidad de un resultado positivo terapia de HBV, a pesar de que la condición del paciente puede no ser óptima para someterse a dicha terapia, porque se sabe que su probabilidad de un resultado positivo del tratamiento es significativamente más alta que la probabilidad media.

55 Sonneveld et al. (2012, Gastroenterology, Vol. 142, No. 3, pp. 513-520) describen que la presencia de dos polimorfismos cerca del IL28B puede predecir un resultado positivo del tratamiento con Peg-interferón de un paciente con hepatitis B, siempre que el ajuste para etnia se realice. No enseña ni sugiere la detección del alelo G del SNP rs12356193, y mucho menos que esto permita un predictor más robusto para el éxito del tratamiento anti-HBV, independientemente de la etnia.

Como se entenderá por los expertos en el arte, los procedimientos de identificación mencionados anteriormente no están destinados, por lo general, a ser correctos para el 100% de los sujetos que se van a analizar. Sin embargo, la

evaluación será válida para una parte estadísticamente significativa de los temas que se analizarán. La persona experta en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. Los valores de p son, preferiblemente, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, o 0.0001. Preferiblemente, la probabilidad prevista por la presente invención permite que la diferenciación sea correcta para al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de los sujetos de una cohorte o población dada.

Las figuras 1 y 2 proporcionan SNP de los genomas humanos y de HBV que están asociados con el resultado del tratamiento de HBV. Los alelos que están asociados con un resultado de tratamiento positivo se representan en la sexta columna de las figuras 1a y 1b, y en la cuarta columna de la figura 2a. Por lo tanto, un aspecto de la invención proporciona un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar SNP rs12356193 en combinación con al menos un otro alelo asociado al resultado positivo de un SNP como se representa en la figura 1 o 2. Se identifica que un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B basándose en la presencia de dicho alelo asociado al resultado positivo. La ausencia de uno o más alelo(s) asociado(s) al resultado positivo de un SNP como se representa en la figura 1 o 2 indica una menor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B.

El término muestra que contiene ácido nucleico se refiere a una muestra de un individuo que contiene ácido nucleico de dicho individuo y/o ácido nucleico de HBV. El término ácido nucleico abarca compuestos que comprenden una cadena de nucleótidos, más preferiblemente ADN y/o ARN. En una realización preferida de la invención, dicha muestra que contiene ácido nucleico es una muestra que contiene ADN. Se prefiere particularmente un hisopo de saliva o muestra de sangre, ya que tal muestra puede tomarse sin mucha incomodidad para el paciente o se toma rutinariamente para otro propósito. En una realización, se usa una muestra de suero. Una ventaja de una muestra de suero es el hecho de que históricamente esta muestra se almacena con mayor frecuencia.

La presente divulgación proporciona además la visión de que los niveles (de expresión) de carnitina y de derivados carnitina en un paciente con hepatitis B susceptible al tratamiento de hepatitis B son significativamente menores que los niveles (de expresión) de carnitina y de derivados carnitina en pacientes con hepatitis B que no son susceptibles al tratamiento de la hepatitis B (véanse, por ejemplo, las figuras 12 y 13). Ahora que se ha proporcionado esta visión, ha sido posible determinar si un determinado paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B. Por ejemplo, se determina un nivel de expresión de carnitina o un derivado de carnitina tal como acetil-L-carnitina y propionil-L-carnitina de un paciente dado usando cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica. Posteriormente, el valor obtenido se compara preferiblemente con una referencia. A partir de dicha comparación, el paciente evaluado se clasifica como respondedor o no respondedor. En una realización, el valor obtenido del paciente probado se compara con un valor de referencia de un grupo respondedor. Si el valor obtenido corresponde a/es esencialmente igual a este valor de referencia, o es inferior, el paciente evaluado se clasificará como respondedor. Sin embargo, si el valor obtenido es significativamente mayor, el paciente evaluado se clasificará como no respondedor. Alternativamente, o adicionalmente, el valor obtenido del paciente probado se compara con un valor de referencia de un grupo no respondedor. Si el valor obtenido corresponde a/es esencialmente igual a este valor de referencia, o es más alto, el paciente evaluado se clasifica como no respondedor. Sin embargo, si el valor obtenido es significativamente menor, el paciente evaluado se clasificará como respondedor.

En principio, cualquier muestra que contenga productos de expresión de carnitina y/o derivados de carnitina es apropiada para un procedimiento descrito en este documento. Se puede usar una muestra de sangre o una muestra de plasma, ya que tal muestra puede tomarse sin mucha incomodidad para el paciente o se toma rutinariamente para otro propósito. En un aspecto, se usa una muestra de suero. Una ventaja de una muestra de suero es el hecho de que históricamente esta muestra se almacena con mayor frecuencia. Preferiblemente, un "nivel de expresión" de carnitina o un derivado de carnitina se refiere al nivel de carnitina como tal o al derivado de carnitina como tal en una muestra.

Por lo general, si se usa una muestra de plasma, un paciente con hepatitis B que tiene un nivel de expresión de carnitina que es igual o inferior a 34 micromol/litro, preferiblemente igual o inferior a 33.3 micromol/litro, se clasifica como respondedor, mientras que un paciente que tiene un nivel de expresión de carnitina que es superior a 34 micromol/litro, preferiblemente más de 33.3 micromol/litro, se clasifica como no respondedor. Un paciente que tiene un nivel de expresión de acetil-L-carnitina que es igual o inferior a 3.89 micromol/litro se clasifica como respondedor, mientras que un paciente que tiene un nivel de expresión de acetil-L-carnitina que es superior a 3.89 micromol/litro se clasifica como no respondedor. Un paciente que tiene un nivel de expresión de acetil-L-carnitina que es igual o inferior a 3.0 micromol/litro se puede clasificar como respondedor, mientras que un paciente que tiene un nivel de expresión de acetil-L-carnitina superior a 3.0 micromol/litro se clasifica como un no respondedor. Adicionalmente, un paciente que tiene un nivel de expresión de propionil-L-carnitina que es igual o inferior a 0.4 micromol/litro, preferiblemente igual o inferior a 0.43 micromol/litro, se clasifica por lo general como respondedor, mientras que un paciente que tiene un nivel de expresión de propionil-L-carnitina que es superior a 0.4 micromol/litro, preferiblemente más de 0.43 micromol/litro, se clasifica como no respondedor.

El valor obtenido de un paciente probado se puede comparar con un valor de referencia de un grupo respondedor y con un valor de referencia de un grupo no respondedor, y se determina qué valor de referencia está más cerca del valor de prueba obtenido. El paciente evaluado se clasifica como perteneciente al grupo cuyo valor de referencia es el más cercano al valor de la prueba.

5 Se describe por lo tanto un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra de dicho paciente con hepatitis B comprende un nivel de expresión de carnitina o un derivado de carnitina que se asocia con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B. Preferiblemente, se determina si una muestra de dicho paciente con hepatitis B comprende un nivel de carnitina o un derivado de carnitina que está asociado con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B. Dicho derivado de carnitina puede comprender acetil-L-carnitina y/o propionil-L-carnitina. Preferiblemente, la cantidad de carnitina o derivado de carnitina se compara con al menos un valor de referencia, como se explicó anteriormente. En una realización, se determina si el nivel de expresión de carnitina en una muestra de plasma es igual o inferior a 33.3 micromol/litro (respondedor) o superior a 33.3 micromol/litro (no respondedor). En una realización, se determina si el nivel de expresión de acetil-L-carnitina en una muestra de plasma es igual o inferior a 3.89 micromol/litro (respondedor) o superior a 3.89 micromol/litro (no respondedor). En una realización, se determina si el nivel de expresión de propionil-L-carnitina en una muestra de plasma es igual o inferior a 0.43 micromol/litro (respondedor) o superior a 0.43 micromol/litro (no respondedor). En una realización preferida adicional, se determina si el nivel de expresión de carnitina en una muestra de plasma es igual o inferior a 29 micromol/litro (respondedor) o superior a 29 micromol/litro (no respondedor). Un paciente con hepatitis B que tiene un nivel de expresión de carnitina en plasma de 29 micromol/litro o menos tiene incluso mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B.

Un paciente con hepatitis B crónica se define como un individuo que ha sido diagnosticado con una infección por el virus de la hepatitis B (también llamada infección por HBV) durante más de seis meses.

25 Por lo general, la presencia de HBV se diagnostica mediante la detección de al menos un polipéptido vírico en una muestra de un sujeto, más preferiblemente, se detecta al menos uno de los antígenos víricos HBs (HBsAg, Genbank Acc. No.: AAL66340.1 GI:18252577, SEQ ID NO: 1), Hbc (HbcAg, Genbank Acc. No.: CAA51257.1 GI:288930, SEQ ID NO: 2), y HBe (HBeAg, Genbank Acc. No.: AAM96930.1 GI:22530876, SEQ ID NO: 3). El experto en el arte entiende que los polipéptidos de HBV se mencionan como biomarcadores, no como polipéptidos específicos, y que el término HBV abarca diversas cepas de HBV que pueden comprender variantes de secuencia de los polipéptidos de HBV mencionados anteriormente. De acuerdo con lo anterior, los polipéptidos mencionados anteriormente que tienen las secuencias específicas depositadas bajo los números de acceso de Genbank deben entenderse como secuencias de ejemplo que representan un biomarcador. Por consiguiente, también es posible detectar polipéptidos variantes que varían debido a al menos una adición, sustitución, delección y/o modificación de aminoácidos de los polipéptidos de HBV mencionados anteriormente siempre que también sean apropiados como biomarcadores para una infección por HBV como se discutió anteriormente. Preferiblemente, los polipéptidos variantes son al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idénticos a los polipéptidos específicos mencionados anteriormente.

40 El término "idéntico" como se usa en este documento se refiere a la identidad de secuencia caracterizada por determinar el número de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos, respectivamente, en donde las secuencias están alineadas de modo que la coincidencia de orden más alta adquirido. Puede calcularse usando técnicas publicadas o procedimientos codificados en programas informáticos tales como, por ejemplo, BLASTP, BLASTN o FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403). Los valores de porcentaje de identidad son, en un aspecto, calculados sobre la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos completa. Una serie de programas basados en una variedad de algoritmos está disponible para el trabajador calificado para comparar diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente confiables. Para llevar a cabo las alineaciones de secuencia, el programa PileUp (Higgins 1989, CABIOS 5, 151) o los programas Gap y BestFit (Needleman 1970, J Mol Biol 48; 443; Smith 1981, Adv Appl Math 2, 482), que son parte del paquete de software GCG (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711), se puede usar. Los valores de identidad de secuencia enumerados en este documento en porcentaje (%) se determinarán usando el programa GAP en toda la región de secuencia con las siguientes configuraciones: Peso de Gap: 50, peso de longitud: 3, emparejamiento promedio: 10,000 y emparejamiento erróneo promedio: 0.000, que, a menos que se especifique lo contrario, se usará siempre como configuración estándar para las alineaciones de secuencia.

55 También preferiblemente, la presencia de HBV se detecta detectando al menos un polinucleótido vírico, preferiblemente ADN vírico, en una muestra de un sujeto. Las secuencias de nucleótidos de los polinucleótidos virales o el genoma de HBV completo son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos de HBV se depositan bajo el número de acceso de Genbank NC_003977.1. El experto en el arte entiende que los polinucleótidos de HBV se mencionan como biomarcadores, no como polinucleótidos específicos, y que el término HBV abarca diversas cepas de HBV que comprenden secuencias de nucleótidos variantes. De acuerdo con lo anterior, los polinucleótidos mencionados anteriormente que tienen las secuencias específicas depositadas bajo el número de acceso de Genbank se deben entender como secuencias de ejemplo que representan un biomarcador. Por consiguiente, también es posible detectar

5 polinucleótidos variantes que varían debido a al menos una adición, sustitución, delección y/o modificación de nucleótidos de los polinucleótidos mencionados anteriormente siempre que también sean apropiados como biomarcadores para una infección de HBV como se discutió anteriormente. Preferiblemente, los polinucleótidos variantes son al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idénticos a los polinucleótidos específicos mencionados anteriormente. La identidad se puede calcular como se establece anteriormente en este documento.

10 Preferiblemente, el término infección por HBV a la que se hace referencia en este documento es una infección crónica por HBV. Una infección crónica por HBV se caracteriza preferiblemente por la presencia detectable de HBV en un sujeto durante más de seis meses. Más preferiblemente, una infección crónica por HBV a la que se hace referencia sigue la definición publicada por the Center for Disease Control (CDC), según el cual una infección crónica por HBV se caracteriza por los siguientes criterios de laboratorio: anticuerpos IgM contra el antígeno del núcleo de hepatitis B (IgM anti-HBc) negativo y un resultado positivo en uno de los siguientes exámenes: antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), antígeno e de hepatitis B (HBeAg), OR de ADN del virus de hepatitis B (HBV) o HBsAg positivo o ADN de HBV positivo dos veces al menos 6 meses separados (cualquier combinación de estas pruebas realizadas con 6 meses de diferencia es aceptable).

15 Una realización preferida proporciona, por lo tanto, un procedimiento según la invención, en el que dicho paciente con hepatitis B padece de hepatitis B crónica.

20 Una secuencia de ácido nucleico en la que es posible más de una secuencia en una población se denomina en este documento "sitio polimórfico". Los sitios polimórficos pueden permitir diferencias en las secuencias basadas en sustituciones, inserciones o delecciones. Tales sustituciones, inserciones o delecciones pueden dar como resultado desplazamientos en el marco, la generación de codones de parada prematuros, la delección o adición de uno o más aminoácidos codificados por un polinucleótido, alterar sitios de empalme y afectar a la estabilidad o transporte de ARNm. Cuando un sitio polimórfico tiene un solo nucleótido de longitud, el sitio se denomina polimorfismo de un solo nucleótido ("SNP").

25 El término "SNP" se refiere a un polimorfismo de un solo nucleótido en una posición particular en el genoma de un mamífero que varía entre una población de individuos. Como se usa en este documento, un SNP se puede identificar por su nombre o por su ubicación dentro de una secuencia particular. Los SNP identificados en la figura 1b se indican mediante corchetes. Por ejemplo, el SNP "[A/G]" en la secuencia de rs12356193 en la figura 1b indica que la base de nucleótidos (o el alelo) en esa posición en la secuencia puede ser adenina o guanina. El alelo asociado con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B (por ejemplo, una guanina en rs12356193) está indicado en la columna seis de las figuras 1a y 1b, o en la columna cuatro de la figura 2a. Los nucleótidos que flanquean los SNP en la figura 1b son las secuencias flanqueantes que son útiles para identificar la ubicación del SNP en el genoma. Como se usa en este documento, las secuencias de nucleótidos a las que se hace referencia en la presente solicitud abarcan los complementos de dichas secuencias de nucleótidos. Además, como se usa en este documento, el término "SNP" abarca cualquier alelo entre un conjunto de alelos.

30 El término "alelo" se refiere a un nucleótido específico entre una selección de nucleótidos que definen un SNP.

40 El término "alelo asociado a resultado positivo" o "alelo de resultado positivo" se refiere a un alelo que está asociado con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B. Los tipos preferidos de tratamiento de hepatitis B y los tipos preferidos de resultado de tratamiento positivo se describen a continuación en este documento. Las sextas columnas de las figuras 1a y 1b y la cuarta columna de la figura 2a muestran alelos positivos asociados a resultados según la presente invención.

El término "haplotipo" se refiere a una combinación de alelos particulares de dos o más SNP.

El término "haplotipo de resultado positivo" se refiere a un haplotipo que está asociado con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B.

45 El término "polinucleótido" se refiere a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional que incluya estructuras moleculares monocatenarias, bicatenarias y triples helicoidales, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Las siguientes son realizaciones no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, moléculas de ácido nucleico interferentes cortas (ANic), ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, aislados ADN de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido también puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas, tales como moléculas de ácido nucleico metilado y análogos de molécula de ácido nucleico.

55 Un polinucleótido "sustancialmente aislado" o "aislado" es uno que está sustancialmente libre de las secuencias con las que está asociado en la naturaleza. Por sustancialmente libre se entiende al menos el 50%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% libre de los materiales con los que está asociado en la naturaleza. Un "polinucleótido aislado"

también incluye polinucleótidos recombinantes que, en virtud del origen o la manipulación: (1) no están asociados con la totalidad o una parte de un polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza, o (2) están unidos a un polinucleótido aparte de aquello a lo que está vinculado en la naturaleza, o (3) no ocurre en la naturaleza.

5 El término "vector" se refiere a una molécula de ADN que puede transportar ADN insertado y perpetuarse en una célula huésped. Los vectores también se conocen como vectores de clonación, vehículos de clonación o vehículos. El término "vector" incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de una molécula de ácido nucleico en una célula, vectores de replicación que funcionan principalmente para la replicación de ácidos nucleicos y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores.

10 Con un procedimiento según la presente invención, es posible determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B. Como se usa en este documento, un resultado positivo puede tener varias manifestaciones clínicas. En una realización, un resultado positivo se define como una disminución de HBsAg de más de 1.5 log en la sangre de dicho paciente. Preferiblemente, dicha disminución de HBsAg se observa en o antes de la semana 24 de la terapia. Esto significa que la cantidad de HBsAg detectable disminuye más rápidamente que la disminución media de HBsAg observada en una población de hepatitis B que recibe el mismo tipo de tratamiento. La disminución rápida es indicativa de una mayor probabilidad de supresión o curación de la hepatitis B, incluida una mayor probabilidad de seroconversión de HBsAg, aunque esto no siempre ocurre. La seroconversión de HBsAg se define como la pérdida de HBsAg detectable en la sangre de un paciente y la aparición de anticuerpos anti-HBs en la sangre. Una realización proporciona de este modo un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de una disminución de HBsAg de más de 1.5 log en su sangre a o antes de la semana 24 de la terapia de HBV, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con hepatitis B comprende el alelo G del SNP rs12356193, opcionalmente en combinación con al menos un alelo adicional asociado al resultado positivo de un SNP como se representa en la figura 1 y/o en la figura 2 y/o determinar si una muestra de dicho paciente con hepatitis B comprende un nivel de expresión de carnitina o de un derivado de carnitina (preferiblemente acetil-L-carnitina y/o propionil-L-carnitina) que está asociado con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B.

30 En una realización preferida, un resultado positivo de un tratamiento de hepatitis B se define como una respuesta virológica sostenida. Esto significa que se obtienen niveles de ADN de HBV iguales o inferiores a 2,000 UI/mL de sangre y los niveles de alanina aminotransferasa se normalizan a los 2 años de seguimiento. Además, se proporciona por lo tanto un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de una respuesta virológica sostenida después del tratamiento con HBV, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con hepatitis B comprende el alelo G del SNP rs12356193, opcionalmente en combinación con al menos un alelo asociado al resultado positivo de un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 y/o determinar si una muestra de dicho paciente con hepatitis B comprende un nivel de expresión de carnitina o un derivado de carnitina (preferiblemente acetil-L-carnitina y/o propionil-L-carnitina) que se asocia con un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B.

40 En una realización particularmente preferida, un resultado positivo de un tratamiento de hepatitis B se define como pérdida de HBsAg. Esto significa que el HBsAg ha desaparecido de la sangre. La depuración de HBsAg representa el punto final más cercano a una cura clínica y se asocia con una mejor supervivencia y un menor riesgo de desarrollo de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Como se muestra en los ejemplos, se describen SNP que incluso están asociados con este resultado más favorable. También, los niveles de carnitina y derivados de carnitina parecen estar correlacionados con este resultado más favorable. Además, se proporciona por lo tanto un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de pérdida de HBsAg después del tratamiento con HBV, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con hepatitis B comprende el alelo G de SNP rs12356193, opcionalmente en combinación con al menos un alelo positivo asociado al resultado de un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 y/o determinar si una muestra de dicho paciente con hepatitis B comprende un nivel de expresión de carnitina o de un derivado de carnitina (preferiblemente acetil-L-carnitina y/o propionil-L-carnitina) que se asocia con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B. Preferiblemente, dicho paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de pérdida de HBsAg con seroconversión anti-HBs (lo que significa que los anticuerpos anti-HBs son detectables en la sangre del individuo después del tratamiento).

55 Una realización preferida proporciona de este modo un procedimiento según la invención para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B, en el que dicho resultado positivo se selecciona del grupo que consiste en la pérdida de HBsAg, pérdida de HBsAg con seroconversión anti-HBs, respuesta virológica sostenida y una disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la sangre de dicho paciente a o antes de la semana 24 de la terapia. Preferiblemente, cualquiera de tales procedimientos se realiza antes del inicio de dicha terapia de hepatitis B, para predecir el resultado del tratamiento.

60 En una realización preferida, la susceptibilidad de un paciente con hepatitis B para un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B se determina con un procedimiento según la invención, en el que dicho tratamiento de hepatitis B comprende la administración de interferón. Preferiblemente, el interferón al que se hace referencia en este contexto es

un interferón unido covalentemente a polietilenglicol (PEG-interferon). Más preferiblemente, el término interferón abarca interferón 2 alfa, más preferiblemente interferón 2 alfa unido covalentemente a polietilenglicol (PEG-interferon 2 alfa, disponible comercialmente como Pegasys®). Otros ejemplos no limitantes preferidos de compuestos de interferón terapéuticos actualmente conocidos son PEG-interferon alfa2b (Peg-Intron), peg-Interferon Lambda, Locteron (que es el interferón alfa2b presente en biosferas), interferón de consenso (que es un compuesto de interferón genéticamente modificado) compartiendo 88% de homología con IFN-alfa y 30% con IFN-beta) e IFN-gamma.

El tratamiento de pacientes con hepatitis B con interferón u otros inmunomoduladores tales como, por ejemplo, agonistas del receptor tipo Toll se combina preferiblemente con el tratamiento con un inhibidor de la ADN polimerasa viral con el fin de mejorar la respuesta al tratamiento. Preferiblemente, un inhibidor de la ADN polimerasa viral es un análogo de nucleótido o un análogo de nucleósido. De este modo, un procedimiento preferido según la invención determina si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo de un tratamiento con interferón en combinación con un análogo de nucleótido o un análogo de nucleósido. Más preferiblemente, dicho tratamiento comprende el tratamiento con interferón 2 alfa en combinación con un análogo nucleotídico o análogo nucleósido e incluso más preferiblemente dicho tratamiento comprende el tratamiento con PEG-interferon o PEGinterferon 2 alfa (por ejemplo, Pegasys®) u otros inmunomoduladores en combinación con un análogo de nucleótido o análogo de nucleósido. Varios análogos de nucleótidos o nucleósidos son conocidos en la técnica. Los ejemplos preferidos no limitantes son lamivudina, adefovir, adefovir dipivoxil, entecavir, tenofovir, tenofovir disoproxil fumarato y telbivudina. Estos análogos de nucleótidos/nucleósidos son bien conocidos en la técnica. En breve, la lamivudina es un análogo de la citidina. Puede inhibir la transcriptasa inversa de la hepatitis B. Se fosforila a metabolitos activos que compiten por la incorporación en el ADN viral.

Adefovir es un análogo de nucleótido de fosfonato acíclico oral que inhibe la polimerasa de HBV por terminación de la cadena. El principal beneficio de adefovir sobre lamivudina (el primer NRTI aprobado para el tratamiento de la hepatitis B) es que toma un período de tiempo mucho más largo antes de que el virus desarrolle resistencia a este. Adefovir dipivoxil contiene dos unidades de pivaloiloximetilo, por lo que es una forma de profármaco de adefovir.

Entecavir es un análogo de ciclopentil guanosina oral que inhibe el cebado del ADN del HBV. La transcripción del ADN del HBV en cadena negativo y la síntesis del ADN del HBV de cadena positiva se invierten.

Tenofovir es un análogo nucleotídico que bloquea la transcriptasa inversa. Tenofovir disoproxil fumarato es una forma de profármaco de tenofovir.

La telbivudina es el isómero L de la timidina y causa la terminación de la cadena del ADN del HBV.

Una realización particularmente preferida proporciona de este modo un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con Hepatitis B comprende el alelo G del SNP rs12356193, opcionalmente en combinación con al menos un alelo asociado al resultado positivo de un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 y/o si una muestra de dicho paciente con hepatitis B comprende un nivel de expresión de carnitina o de un derivado de carnitina que está asociado con un resultado positivo de tratamiento de hepatitis B, en el que dicho tratamiento de hepatitis B comprende la administración de interferón (preferiblemente interferón 2 alfa o interferón pegilado, más preferiblemente interferón PEG 2 alfa) en combinación con un análogo de nucleósido o nucleótido seleccionado del grupo que consiste en lamivudina, adefovir, adefovir dipivoxil, entecavir, tenofovir, tenofovir disoproxil fumarato y telbivudina.

En una realización particularmente preferida, la susceptibilidad de un paciente con hepatitis B para un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B se determina con un procedimiento según la invención, en el que dicho tratamiento de hepatitis B comprende la administración de interferón (preferiblemente interferón 2 alfa o interferón pegilado, más preferiblemente PEG-interferon 2 alfa) en combinación con adefovir o tenofovir. Más preferiblemente, dicho tratamiento comprende el tratamiento con PEG-interferon 2 alfa, por ejemplo, PEGasys®, en combinación con adefovir o tenofovir, preferiblemente adefovir. Por lo general, el tratamiento con PEGasys® se realiza por administración subcutánea (inyección subcutánea semanal) durante 48 semanas, mientras que los inhibidores de la ADN polimerasa viral (análogo de nucleósido/nucleótido) se administran por vía oral durante más tiempo, esto es, durante más de un año en el 80% de los pacientes. Sin embargo, en los regímenes de terapia de combinación actuales, los inhibidores de la ADN polimerasa viral se detienen junto con PEG-interferon después de 48 semanas. Para detalles, véase también J.L. Dienstag N Engl J Med 2008, 359; 1486-1500.

La figura 1 muestra varios SNP del genoma humano que están asociados con el resultado del tratamiento de HBV. Un alelo asociado al resultado positivo particularmente preferido es el alelo G del SNP rs12356193. Como se muestra en los ejemplos, este alelo de rs12356193 se asoció significativamente con la pérdida de HBsAg al final del seguimiento del tratamiento de HBV, con un valor de p de 2.61E-09 y una frecuencia de alelo menor global de 0.11. La invención proporciona por lo tanto un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con hepatitis B comprende al menos el alelo G del SNP rs12356193.

Otro alelo asociado al resultado positivo particularmente preferido es T784G en el genoma del HBV, lo que significa que una guanina está presente en la posición del HBV 784 en lugar de una timina. Como se usa en este documento, las posiciones de nucleótidos del HBV se definen como las posiciones en las secuencias de referencia específicas de genotipo adw2 (X02763), aad (D00330), (AB033556), ayw (X02496) y (X75657) para los genotipos A, B, C, D y E, respectivamente, o posiciones correspondientes a las mismas en otras cepas de HBV. Para cada cepa de HBV individual, el experto en el arte es capaz de determinar las posiciones de nucleótidos correspondientes a las posiciones de las cepas de referencia mencionadas anteriormente, por ejemplo, alineando usando el software de análisis de secuencias ClustalW Multiple Alignment en BioEdit (Hall, TA 1999. BioEdit: a programa de análisis y editor de alineación de secuencias biológicas fácil de usar para Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98). Se muestra en los ejemplos que el alelo T784G está significativamente asociado con la pérdida de HBsAg en la semana 96 después de la corrección de Bonferroni para múltiples pruebas. Este alelo ocurrió en 4 de 9 pacientes que alcanzaron la pérdida de HBsAg en la semana 96 y en ninguno de los pacientes que no lograron la pérdida de HBsAg. Se describe por lo tanto un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con hepatitis B comprende al menos el alelo HBV T784G.

Es ventajoso determinar si está presente más de un alelo de SNP asociado al resultado positivo representado en la figura 1 y/o la figura 2 en una muestra que contiene ácido nucleico, con el fin de aumentar el valor predictivo para el resultado del tratamiento del HBV. Un procedimiento puede comprender determinar si al menos 2, preferiblemente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alelos de SNP asociados al resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 están presentes en dicha muestra. Un paciente de HBV que comprende al menos dos alelos de SNP asociados al resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 tiene un denominado "haplotipo de resultado positivo". En una realización preferida, se determinan tanto el SNP rs12356193 como un SNP de HBV en la posición 784. Se determina preferiblemente si el alelo G del SNP rs12356193 y el alelo del HBV T784G está presente en una muestra que contiene ácido nucleico, preferiblemente en combinación con al menos un otro alelo de SNP asociado al resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2. Más preferiblemente, se determina si tanto el alelo G de SNP rs12356193 como el alelo HBV T784G están presentes en una muestra que contiene ácido nucleico, opcionalmente en combinación con al menos otro alelo de SNP asociado al resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2.

También se describe la determinación de polimorfismos de nucleótidos de HBV en las posiciones 784 y 1888 (o posiciones correspondientes a las mismas en cepas de HBV distintas de las cepas de consenso mencionadas anteriormente). El alelo G1888W también está asociado con la pérdida de HBsAg en la semana 96 después de comenzar el tratamiento con HBV, como se muestra en los ejemplos. Por consiguiente, tanto la prueba de polimorfismos de nucleótidos del HBV en las posiciones 784 y 1888 (o las posiciones correspondientes a las mismas en cepas de HBV distintas de las cepas de consenso mencionadas anteriormente) aumenta el valor predictivo para el resultado del tratamiento de HBV. Es de destacar que la presencia de un SNP en el genoma del HBV depende del genotipo del HBV, usando como referencia la cepa de referencia específica del genotipo. Por lo tanto, por ejemplo, se observó el alelo A1135H en el genotipo A, y el alelo C1135H en los genotipos B, C, D y E.

En otra realización preferida, se prueban SNP de HBV en las posiciones 784, 1888 y/o 97 (o posiciones correspondientes a las mismas en cepas de HBV distintas de las cepas de consenso mencionadas anteriormente). En los ejemplos, se muestra que un alelo G97A también está asociado con la pérdida de HBsAg en la semana 96 después de comenzar el tratamiento con HBV. Por consiguiente, la prueba de polimorfismos de nucleótidos del HBV en las posiciones 784 y 1888 o las posiciones 784 y 97 aumenta aún más el valor predictivo para el resultado del tratamiento del HBV.

Cualquiera de los alelos de HBV mencionados anteriormente se ensaya en combinación con al menos el SNP rs12356193, opcionalmente además en combinación con al menos un otro SNP representado en la figura 1, con el fin de aumentar aún más el valor predictivo para el resultado del tratamiento de HBV.

En determinadas realizaciones, la invención también proporciona interferón u otro inmunomodulador, opcionalmente en combinación con un inhibidor de la ADN polimerasa viral (preferiblemente un análogo de nucleósido o análogo de nucleótido), para usar en un procedimiento para tratar la hepatitis B, caracterizado en que un paciente con hepatitis B es tratado que ha resultado positivo para el alelo G del SNP rs12356193, opcionalmente en combinación con al menos un alelo SNP asociado al resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 y/o que ha resultado positivo para un nivel asociado con el resultado positivo de carnitina o de un derivado de carnitina.

Como se explicó anteriormente, la presencia de tal alelo de SNP asociado al resultado positivo, y/o la presencia de tal nivel asociado a resultado positivo de carnitina o de un derivado de carnitina, en una muestra de un paciente con HBV dado es indicativo de una mayor probabilidad de dicho individuo es respondedor de la terapia, en comparación con la población media de hepatitis B crónica, que provocará, por ejemplo, pérdida de HBsAg, respuesta virológica sostenida y/o una disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la sangre de dicho paciente en o antes de la semana 24 de terapia. Por lo tanto, a dicho paciente con HBV se le prescribirá más fácilmente la terapia contra el HBV, aunque la afección del paciente puede no ser óptima. Por otro lado, si un paciente dado se prueba negativo para un alelo o haplotipo del SNP

- 5 resultado de tratamiento positivo, y/o negativo para un nivel asociado al resultado de tratamiento positivo de carnitina o de un derivado de carnitina, el/ella puede ser excluido de la terapia, evitando así los costos innecesarios, carga de tratamiento y efectos secundarios. Preferiblemente, un paciente con hepatitis B se trata con terapia de HBV que ha resultado positivo para al menos el alelo G del SNP rs12356193 y el alelo T784G del genoma del HBV, opcionalmente en combinación con al menos un otro alelo del SNP relacionado con el resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 tal como, por ejemplo, un alelo de HBV A/C1135H y/o un alelo de HBV G1888W.
- En otra realización preferida, un paciente con hepatitis B se trata con terapia de HBV que se ha probado para un nivel de carnitina en plasma y que el nivel de carnitina probado era igual o inferior a 33.3 micromol/litro, preferiblemente igual o inferior a 29 micromol/litro.
- 10 En otra realización preferida más, un paciente con hepatitis B se trata con terapia de HBV que se ha probado para un nivel de acetil-L-carnitina en plasma y cuyo nivel de acetil-L-carnitina probado era igual o inferior a 3.89 micromol/litro.
- En otra realización preferida más, un paciente con hepatitis B se trata con terapia de HBV que se ha probado para un nivel de propionil-L-carnitina en plasma y que el nivel probado de propionil-L-carnitina era igual o inferior a 0.43 micromol/litro.
- 15 Como se describió en este documento anteriormente, dicho tratamiento de HBV comprende preferiblemente la administración de interferón, preferiblemente interferón 2 alfa o interferón pegilado, más preferiblemente interferón PEG 2 alfa. Otros ejemplos no limitantes preferidos de compuestos de interferón terapéuticos actualmente conocidos son PEG-interferon alfa 2b (Peg-Intron), peg-Interferón Lambda, Locteron, interferón consenso e IFN-gamma.
- Dicho tratamiento con interferón se combina preferiblemente con un inhibidor de la ADN polimerasa viral, tal como un análogo de nucleósido o nucleótido. Tal análogo de nucleósido o nucleótido se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en lamivudina, adefovir, adefovir dipivoxil, entecavir, tenofovir, tenofovir disoproxil fumarato y telbivudina.
- 20 Ahora que la presente invención ha proporcionado la visión de que el resultado del tratamiento de la hepatitis B está asociado con determinados SNP en el genoma del individuo infectado y en el genoma del HBV, ha sido posible producir una colección de moléculas de ácido nucleico que comprende secuencias asociadas al resultado del tratamiento del HBV. Tal colección es particularmente apropiada para analizar un paciente con HBV para el resultado del tratamiento del HBV. Por lo tanto, tal colección se denomina "colección dedicada al resultado del tratamiento del HBV" o "colección dedicada al HBV". Por supuesto, otras secuencias de ácido nucleico pueden estar presentes en tal colección dedicada de HBV, tal como por ejemplo ácidos nucleicos y calibradores de referencia, siempre que al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de los polinucleótidos de la colección dedicada al HBV comprenden un SNP que está asociado con el resultado del tratamiento del HBV, preferiblemente seleccionado de los SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2. Una colección dedicada al HBV puede ser, por ejemplo, en forma de un kit de partes, una matriz, micromatriz o un vector. Además, se proporciona un kit de partes o matriz o micromatriz que comprende al menos dos polinucleótidos que comprenden SNP rs12356193, en el que al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente a al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% de los polinucleótidos comprendidos por dicho kit de partes o matriz o micromatriz comprenden un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2.
- 25 Tal colección dedicada al HBV es particularmente apropiada para analizar una muestra que contiene ácido nucleico de un paciente con HBV con el fin de evaluar si dicho paciente es susceptible al tratamiento de la hepatitis B. Por lo tanto, también se proporciona un uso de un kit de partes o matriz o micromatriz o vector para la tipificación de una muestra que contiene ácido nucleico de un paciente con hepatitis B, así como el uso de un kit de partes o matriz o micromatriz o vector para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B. Como se dijo anteriormente, dicho paciente con hepatitis B es preferiblemente un paciente con hepatitis B crónica.
- 30 Un kit de partes o matriz o micromatriz preferiblemente comprende un conjunto de cebadores o una sonda, teniendo cada uno de dichos cebadores o sonda una longitud, independientemente entre sí, de entre 8 y 50 nucleótidos, preferiblemente entre 8 y 30 nucleótidos, más preferiblemente entre 8 y 25 nucleótidos, caracterizado porque al menos 70% de dichos cebadores o sonda son complementarios a una secuencia que comprende un SNP como se representa en la figura 1 o figura 2. Tales cebadores y sondas son particularmente apropiados para detectar y/o amplificar polimorfismos de nucleótidos del genoma humano y/o del HBV que están asociados con el resultado del tratamiento del HBV, permitiendo así tipificar una muestra que contiene ácido nucleico de un paciente con hepatitis B. Se describe adicionalmente un uso de al menos un polinucleótido aislado que comprende un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 para la tipificación de una muestra que contiene ácido nucleico de un paciente con hepatitis B. La longitud de tal polinucleótido aislado está preferiblemente entre 8 y 50 nucleótidos, más preferiblemente entre 8 y 30 nucleótidos, más preferiblemente entre 8 y 25 nucleótidos. Preferiblemente, dicho al menos un polinucleótido es al menos 80% complementario a un tramo de al menos 8, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 15 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de la figura 1 o 2. Por supuesto, debe
- 35 40 45 50 55

5 estar bien definido para el que alelo dicho polinucleótido es específico. Por consiguiente, el nucleótido que define el alelo SNP no debe variar. Las secuencias flanqueantes de dichos SNP pueden, sin embargo, variar hasta cierto punto en comparación con las secuencias flanqueantes naturales. Más preferiblemente, se usa al menos un polinucleótido que es complementario al alelo G del SNP rs12356193 y/o el alelo T784G del HBV, ya que estos alelos están significativamente asociados con un resultado positivo del tratamiento del HBV.

10 También se describe un procedimiento para analizar la presencia de ácido nucleico que comprende un alelo de SNP asociado al resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2 en una muestra, que comprende poner en contacto dicha muestra con al menos un polinucleótido que comprende un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2, y determinar si dicho polinucleótido se hibrida con el ácido nucleico de muestra. Dicho ensayo comprende preferiblemente un ensayo basado en PCR o un ensayo basado en MLPA. Preferiblemente, se determina si dicho polinucleótido se hibrida con ácido nucleico de la muestra en condiciones rigurosas. El término "hibrida bajo condiciones rigurosas" pretende describir las condiciones de hibridación y lavado en las que las secuencias de nucleótidos son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% idénticas entre sí por lo general permanecen hibridadas entre sí. Tales condiciones rigurosas son conocidas para los expertos en el arte y se pueden encontrar, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y (1989), 6.3.1- 6.3.6. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0.2 x SSC, SDS al 0.1% a 50-65 °C. De nuevo, el nucleótido que define el alelo de SNP debería estar bien definido. Las secuencias flanqueantes del SNP de dicho al menos un polinucleótido son preferiblemente al menos 80% complementarias a una cualquiera de las secuencias de la figura 1 o 2. Más preferiblemente, se usa un polinucleótido en el que las secuencias flanqueantes del SNP son al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente completamente complementario a una cualquiera de las secuencias de la figura 1 o 2. Al menos se usa un polinucleótido que es complementario al alelo G del SNP rs12356193 y/o al alelo T784G del HBV.

25 También se describe un kit de partes, matriz, micromatriz, vector o uso según la invención, en el que dicho al menos un polinucleótido es capaz de amplificar una secuencia de ácido nucleico con una longitud de entre 50 y 600 nucleótidos, preferiblemente entre 100 y 400 nucleótidos, más preferiblemente 150-250 nucleótidos, en el que dicha secuencia comprende un SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2.

30 Se describe además un uso de medios para determinar un nivel de expresión de carnitina y/o un derivado de carnitina (preferiblemente acetil-L-carnitina y/o propionil-L-carnitina), para la tipificación de una muestra de un paciente con hepatitis B.

35 En determinadas realizaciones, la invención también proporciona un procedimiento para determinar si un individuo tiene una predisposición genética para una mayor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si el ácido nucleico genómico de dicho individuo comprende al menos el alelo G de SNP rs12356193, que comprende opcionalmente además determinar si una muestra de dicho individuo comprende un nivel (de expresión) de carnitina y/o un derivado de carnitina que está asociado con un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B.

40 Otra aplicación es la identificación específica de un gen que se asocia con una mayor probabilidad de que un paciente con hepatitis B obtenga un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B. Esto se hace identificando genes implicados con los SNP según la invención. Una vez que se identifica dicho gen, las secuencias de proteína y/o los niveles de expresión de proteína entre respondedores y no respondedores se comparan preferiblemente, por ejemplo, para obtener una visión de las vías moleculares implicadas en una mayor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de HBV. Se describe un procedimiento para identificar un gen asociado con una mayor probabilidad de que un paciente con hepatitis B obtenga un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende:

45 - identificar un gen que contiene un SNP como se muestra en la figura 1, y

- comparar la expresión de dicho gen en un individuo que tiene un alelo asociado a resultado positivo de un SNP como se representa en la figura 1 con la expresión de dicho gen en un individuo que no tiene dicho alelo asociado al resultado positivo para las diferencias que indican que dicho gen está asociado con una mayor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B.

50 En otra realización más, se proporciona un procedimiento en el que también se determina si dicho individuo tiene un contenido de referencia de HBsAg sérico de menos de 387 UI/mL antes del inicio del tratamiento de la hepatitis B. Un contenido de referencia de HBsAg sérico de menos de 387 UI/mL podría usarse como otro parámetro que prediga un resultado positivo del tratamiento de la hepatitis B (R.B. Takkenberg, thesis University of Amsterdam (2011), The Netherlands, chapter 2, ISBN 9789090263045). Por consiguiente, una combinación de un procedimiento según la invención y la determinación del contenido de referencia de HBsAg tiene un valor predictivo incluso mayor para el resultado del tratamiento de la hepatitis B.

Los términos "individuo", "paciente", "huésped" y "sujeto" se usan indistintamente en este documento para referirse a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

5 La presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica.

Como se usa en este documento, la forma singular de cualquier término puede abarcar alternativamente la forma plural y viceversa.

Como se usa en este documento, un derivado de carnitina comprende preferiblemente acetil-L-carnitina y/o propionil-L-carnitina.

10 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan la invención de ninguna manera, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: SNP asociados al resultado del tratamiento del HBV. Cada secuencia correspondiente se puede encontrar en dbSNP por su ID de acceso RefSNP (número rs). Por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs12356193>. El alelo de cada SNP que está asociado con el resultado del tratamiento del HBV correspondiente se muestra en una columna separada (columna 6).

Figura 2: alelos de HBV asociados al resultado del tratamiento positivo contra el HBV. El alelo de cada SNP que está asociado con el resultado del tratamiento del HBV correspondiente se muestra en una columna separada (columna 4) de la figura 2a.

20 Figura 3: Gráfico del análisis de GWA para la pérdida de HBsAg en la semana 96 (eje y: $-\log_{10}$ del valor p usando la prueba Cochran Armitage para la tendencia, eje x: posición en el genoma). rs12356193 se representa en el círculo.

Figura 4: Gráfico Q-Q de pérdida de HBsAg en la semana 96.

Figura 5: Porcentaje de pérdida de HBsAg en diferentes genotipos de rs12356193.

Figura 6: Distribución alélica de rs12356193 en pacientes con y sin pérdida de HBsAg.

25 Figura 7: a). Distribución de los genotipos de rs12356193 entre pacientes con genotipo viral A, D y E.

b). Porcentaje de pérdida de HBsAg en diferentes genotipos de rs12356193 en pacientes con genotipo viral A, D y E.

Figura 8: Representación esquemática de la ubicación del SNP rs12356193 en el cromosoma 10.

Figura 9: Secuencias de cebadores de fusión de PCR.

Figura 10: Combinaciones de cebadores y longitud de amplicón resultante.

30 Figura 11: Flujo de trabajo de secuenciación esquemática.

Figura 12: Niveles medios de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) para diferentes genotipos de rs12356193.

35 Figura 13: Niveles medios de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) para pacientes con pérdida de HBsAg a los 2 años de seguimiento libre de tratamiento y pacientes con persistencia de HBsAg a los 2 años de tratamiento libre de seguimiento.

Figura 14: Niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) según el genotipo de rs12356193 en los 84 pacientes (a); Niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) en pacientes con y sin pérdida de HBsAg en la semana 96 (b) y en la semana 144 (c).

Figura 15: Curva ROC de los niveles de referencia de DL-carnitina (C0) en proporción con la pérdida de HBsAg en la semana 96 en todos los pacientes.

40 Figura 16: Nivel plasmático de DL-carnitina (C0) en pacientes según etnia y sexo.

Figura 17: a) Niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) según el genotipo de rs12356193 en pacientes hombres no asiáticos; b) Niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) en pacientes hombres no asiáticos con y sin pérdida de HBsAg en la semana 96.

Figura 18: Curva ROC de los niveles de referencia de DL-carnitina (C0) en proporción con la pérdida de HBsAg en la semana 96 en pacientes hombres no asiáticos.

Figura 19: Niveles plasmáticos de acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) en plasma según el genotipo de rs12356193 en los 84 pacientes.

5 Figura 20: Niveles plasmáticos de acetil-L-carnitina (C2) en pacientes con y sin pérdida de HBsAg en la semana 96 y en la semana 144.

Figura 21: Niveles plasmáticos de propionil-L-carnitina (C3) en pacientes con y sin pérdida de HBsAg en la semana 96 y en la semana 144.

10 Figura 22: Curva ROC de los niveles de referencia de acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) en proporción con la pérdida de HBsAg en la semana 96 en todos los pacientes.

Figura 23: (a) niveles plasmáticos de acetil-L-carnitina (C2) en plasma según el genotipo de rs12356193 en pacientes hombres no asiáticos; (b) niveles plasmáticos de acetil-L-carnitina (C2) en pacientes hombres no asiáticos con y sin pérdida de HBsAg en la semana 96.

15 Figura 24: (a) niveles plasmáticos de propionil-L-carnitina (C3) según el genotipo de rs12356193 en pacientes hombres no asiáticos; (b) niveles plasmáticos de propionil-L-carnitina (C3) en pacientes hombres no asiáticos con y sin pérdida de HBsAg en la semana 96.

Ejemplos

Ejemplo 1

20 Se analizaron los datos de asociación de todo el genoma de 84 pacientes con hepatitis B crónica activa tratados con peginterferon y adefovir para identificar asociaciones entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y el resultado del tratamiento.

Pacientes-Procedimientos

1. Procedimiento de estudio PEG/ADV

25 En un estudio clínico realizado recientemente en el AMC [(R.B. Takkenberg, thesis University of Amsterdam (2011), The Netherlands, chapter 2, ISBN 9789090263045)]. 84 pacientes con hepatitis B crónica (40 HBeAg positivos, 44 HBeAg negativos) con ADN del HBV $\geq 2 \times 10^4$ IU/mL fueron tratados con Peg INF alfa-2a (Pegasys®) y ADV-dipivoxil (Hepsera®) durante 48 semanas, seguido de un seguimiento sin tratamiento de 24 semanas (y hasta 5 años).

30 Las definiciones de respuesta fueron seroconversión de HBeAg (pérdida de HBeAg con aparición de anticuerpos anti-HBe), SVR (niveles de ADN de HBV $\leq 2,000$ UI/mL y normalización de ALT) y seroconversión de HBsAg (pérdida de HBsAg con la aparición de anti-HBs anticuerpos) durante el seguimiento.



2. Características de referencia de pacientes

35 Hubo una marcada heterogeneidad de ascendencia en la población de estudio. Reflejada en una distribución genotipo de A (26), B (14), C (12), D (23) y E (9). La respuesta virológica sostenida (SVR) se logró en 32 pacientes. La seroconversión de HBeAg ocurrió durante el tratamiento en 14 pacientes HBeAg positivos. La pérdida de antígeno de superficie de la hepatitis B sérica (HBsAg), definida como niveles de HBsAg bajo el límite de detección más bajo (0.05 UI/mL) usando el Abbot Architect, se logró en 9 pacientes al final del seguimiento (11%).

40 No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características de referencia al comparar todos los pacientes. Sin embargo, en los positivos de HBeAg la edad mayor se asoció positivamente con la seroconversión de HBsAg (OR 1.16 por aumento de 1 año al inicio del estudio [CI del 95%, 1.008-1.337] $p=0.039$). En HBeAg negativos, tanto HBsAg de referencia baja (OR 16.96 por disminución de $1 \log_{10}$ UI/mL [CI del 95%, 2.85-101] $p=0.002$) como ADN del HBV (OR 2.36 por disminución de $1 \log_{10}$ IU/mL [CI del 95%, 1.02-5.45] $p=0.044$) se asociaron con una mayor probabilidad de seroconversión de HBsAg. En el análisis multivariado, el HBsAg fue el único predictor independiente de

seroconversión de HBsAg (OR 17.00 por disminución de 1log₁₀ IU/mL [CI del 95% 2.27-12.7; p=0.006]. [Según lo descrito por (R.B. Takkenberg, thesis University of Amsterdam (2011), The Netherlands, chapter 2, ISBN 9789090263045)].

Características de referencia	Seroconversión de HBsAg a 96 semanas		
	General	Sí	No
No. Total de sujetos (%)	84	9 (11%)	74 (88%)
Edad – años	39.5	44.9	38.7
Sexo – No. de sujetos (%)			
Hombres	63	8 (14%)	55 (86%)
Mujeres	21	1 (5%)	20 (95%)
Estado de HBeAg – No. de sujetos (%)			
HBeAg negativo	44	5 (11.4%)	39 (88.6%)
HBeAg positivo	40	4 (12.5%)	36 (87.5%)
Genotipo HBV - No. de sujetos (%)			
A	26	6 (23%)	20 (77%)
B	14	0 (0%)	14 (100%)
C	12	1 (8%)	11 (92%)
D	23	1 (4%)	22 (96%)
E	9	1 (11%)	8 (89%)
Media de ADN de HBV - log IU/mL	6,7	6,3	6,7
Media de HBsAg - log IU/mL	3.8	3.4	3.8
Mediana de ALT - U/L	81	51	90
Puntuación fibrosis Ishak media	1.8	2.2	1.7

5 3. Genotipado

Preparación de muestra de ADN (200 ng de entrada de ADN)

El genotipado de 84 individuos se realizó en Roche (Nutley) usando Illumina Human Omni1-Quad BeadChip (Illumina, Inc. San Diego, USA).

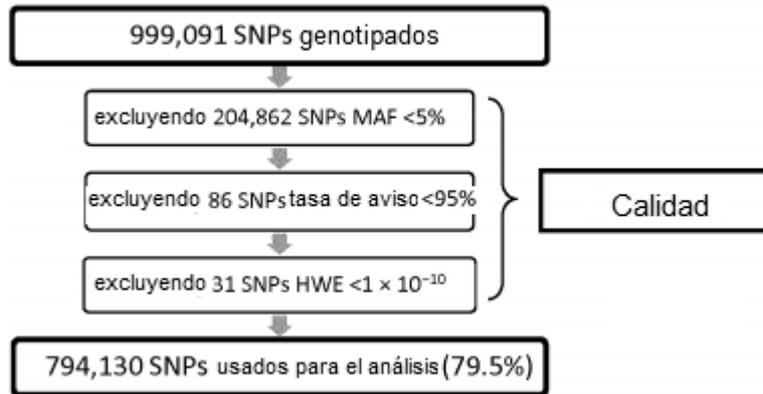
10 Los datos de intensidad de perlas se procesaron y normalizaron en BeadStudio (Illumina); se extrajeron los datos para muestras genotipadas con éxito y se llamaron genotipos dentro de las colecciones usando Illuminus.

4. GWAS y estadísticas

El análisis de GWA se realizó usando el paquete GenABEL* en R Statistical Software. * Aulchenko YS, Ripke S, Isaacs A, Van Duijn CM. GenABEL: una biblioteca R para el análisis de asociación de genoma completo. Bioinformatics (2007) 23 (10): 1294-1296.

15 En total, se genotipificaron 999,091 SNP diferentes en 84 personas. Después del control de calidad, se excluyeron 204,862 (20.5%) SNP con baja frecuencia de alelos menores (<5%), 86 (0.009%) SNP debido a una baja tasa de aviso (> 5% de datos faltantes) y 31 (0.003%) SNP porque estaban fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg (P <1e-10). No se excluyó a ningún paciente debido a la baja tasa de llamadas (<95%), la heterocigosidad autosómica muy alta (FDR <1%) o el IBS muy elevado (> = 0.95). En total 794,130 (79.5%) SNP y 84 (100%) personas pasaron todos los criterios, y se usaron para un análisis posterior.

20



5 El análisis de asociación se realizó sobre la pérdida de HBsAg durante un año de seguimiento sin tratamiento (semana 96) en la población total del estudio. Además, se realizaron análisis de asociación sobre otros resultados del tratamiento (seroconversión de HBeAg, disminución de la SVR y HBsAg en la semana 24) en todos los pacientes combinados y en pacientes agrupados por ascendencia o genotipo viral por separado.

Se produjo una cierta inflación de las estadísticas de resumen, lo que podría ser indicativo de la estratificación de la población (véase gráfico Q-Q, pérdida de HBsAg, semana 96). Los valores de Lambda λ variaron desde 0.97 a 1.07, lo que implica un posible efecto sobre las asociaciones positivas debido a la estratificación de la población.

10 Se evaluó la significación estadística de la asociación con cada SNP usando una prueba de tendencia Cochran-Armitage de 1 grado de libertad. Se aplica una corrección conservadora de Bonferroni para controlar las tasas de errores falsos positivos derivadas de pruebas múltiples y, por lo tanto, se considera que las asociaciones genómicas amplias con un valor de $P < 6.3 \times 10E-8$ ($= 0,05/794,161$) son genéticamente significativas. La razón de probabilidades y los intervalos de confianza se calcularon usando el alelo principal como referencia. Los valores p de HWE se calcularon en GenABEL.

15 **Resultados**

La figura 3 muestra un gráfico de valores de $P -\log_{10}$. Los valores de P se calcularon por prueba de tendencia Cochran-Armitage 1-d.f. El punto circular grande en el cromosoma 10 mostró una asociación significativa amplia del genoma de SNP rs12356193 con pérdida de HBsAg a un año de seguimiento libre de tratamiento (semana 96).

La figura 4 muestra un gráfico Q-Q de pérdida de HBsAg en la semana 96

20 La figura 5 muestra el porcentaje de pérdida de HBsAg en diferentes genotipos de rs12356193.

La figura 6 muestra la distribución alélica de rs12356193 en pacientes con y sin pérdida de HBsAg.

La figura 7 muestra la distribución de los genotipos de rs12356193 entre pacientes con genotipos virales A, D y E y el porcentaje de pérdida de HBsAg en diferentes genotipos de rs12356193 en pacientes con genotipos virales A, D y E.

La figura 8 muestra una representación esquemática de la ubicación del SNP rs12356193 en el cromosoma 10.

Tabla: frecuencia de alelo menor (MAF) de rs12356193 según genotipo viral

Tabla: Frecuencias alélicas de rs12356193 en 9 cohortes de HapMap diferentes*

Origen de la población	País recogido	población HapMap	Recuento de muestras Cro.	Alelo G de rs12356193**
Europeo	Italia	TSI	204	0.196
	USA	CEU	226	0.186
Africano	Nigeria	YRI	294	0.051
	USA	ASW	114	0.088
	Kenya	LWK	220	0.086
	Kenya	MKK	312	0.045
Asiático	China	CHB	274	0.004
	Japón	JPT	90	0.000
	USA	CHD	218	0.005

* Base de datos HapMap (Phase 3 - genotypes & frequencies):
http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r3_B36/

** Alelo G está asociado con la pérdida de HBsAg

Genotipo	MAF*	Total no.
A	0.23	26
B	0.00	14
C	0.00	12
D	0.10	23
E	0.04	9

Discusión

5 El alelo menor de un SNP, rs12356193, se asoció significativamente con la pérdida de HBsAg en un año de seguimiento (figura), con un valor de p de 2.61E-09 y una frecuencia de alelo menor global de 0.12. Este SNP se encuentra en el cromosoma 10 en el gen SLC16A9. La figura 1 también muestra otros SNP que están asociados con el resultado del tratamiento de la hepatitis B, que son apropiados para aumentar el valor predictivo. Los alelos asociados con resultados positivos se representan en la columna seis.

La importancia clínica de estos hallazgos es doble;

- 10 1. En primer lugar, la estratificación del riesgo de los pacientes a través del genotipado SNP ayuda a guiar la toma de decisiones terapéuticas. Identificar a quienes tienen mayor probabilidad de obtener un resultado positivo tal como pérdida de HBsAg, SVR o más de 1.5 log de disminución de HBsAg en la semana 24 ayudará a las decisiones de comenzar o no con el tratamiento basado en peginterferon.
- 15 2. En segundo lugar, la nueva asociación de los loci SLC16A9 con la hepatitis B crónica sugiere un papel importante para este gen en la respuesta al tratamiento del HBV con peginterferon y adefovir. Esta asociación proporciona una nueva visión de la respuesta inmune del huésped a la infección por hepatitis B y ofrece nuevos objetivos potenciales para los agentes terapéuticos.

Ejemplo 2

20 Se analizaron los datos de la secuencia del HBV de 84 pacientes con hepatitis B crónica activa tratados con PEGinterferon y adefovir para identificar asociaciones entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y el resultado del tratamiento.

Pacientes-Procedimientos

1. Procedimiento de estudio PEG/ADF

5 En un estudio clínico realizado recientemente en el AMC [B. Takkenberg *et al.* (R.B. Takkenberg, thesis University of Amsterdam (2011), The Netherlands, chapter 2, ISBN 9789090263045)] 84 pacientes con hepatitis B crónica activa (40 HBeAg positivos, 44 HBeAg negativos) fueron tratados con Peg INF alfa-2a (Pegasys®) y ADF-dipivoxil (Hepsera®) durante 48 semanas, seguido de 24 semanas (y hasta 5 años) de seguimiento sin tratamiento.

2. Pacientes característicos de referencia

10 Hubo una marcada heterogeneidad de ascendencia en la población de estudio. Reflejado en una distribución genotipo de A (26), B (14), C (12), D (23) y E (9). La respuesta virológica sostenida (SVR), se logró en 32 pacientes. La seroconversión de HBeAg ocurrió durante el tratamiento en 14 pacientes HBeAg positivos. La pérdida de antígeno de superficie de la hepatitis B sérica (HBsAg), definida como niveles de HBsAg bajo el límite de detección más bajo de cuantificación (0.05 UI/mL) usando el Abbot Architect, se logró en 9 pacientes al final del seguimiento (11%).

3. Preparación de la muestra

15 Se diseñó un conjunto de conjuntos de cebadores de fusión de PCR para amplificar 13 amplicones y para cubrir el genoma de HBV. Los cebadores específicos de la secuencia se diseñaron con bases degeneradas en posiciones para acomodar las variaciones en las secuencias de referencia del HBV para los genotipos A, B, C, D y E (identificadores de Entrez X02763, D00330, AY123041, J02203, X75657 respectivamente). Los fragmentos de PCR resultantes se inmovilizaron en perlas de captura de ADN a través de una única región monocatenaria para permitir la unión de los fragmentos en una proporción 1: 1 a perlas; esto es, cada fragmento estaba unido a una sola perla.

20 4. Amplificación y secuenciación de PCR en emulsión

25 La biblioteca unida a perlas se emulsionó con reactivos de amplificación en una mezcla de agua en aceite dando como resultado microrreactores que contienen solo una perla con un único fragmento de biblioteca de muestra. Cada fragmento único de biblioteca de muestras se amplificó en paralelo dentro de su propio microrreactor, excluyendo las secuencias competidoras o contaminantes. Las perlas de captura que portan ADN se cargaron en el dispositivo PicoTiterPlate para secuenciar cada perla en un pozo. Después de cargar el dispositivo PicoTiterPlate en un instrumento 454 Genome Sequencer FLX, se hicieron fluir nucleótidos individuales en un orden fijo a través de los pocillos abiertos y las perlas de captura de ADN. La adición de uno (o más) nucleótido(s) complementarios a la cadena plantilla dio como resultado una señal quimioluminiscente registrada por la cámara CCD del instrumento Genome Sequencer FLX. Todo el flujo de trabajo de PCR y la secuenciación se realizaron por 454 Life Sciences, Branford CT.

30 Las figuras 9, 10 y 11 muestran los cebadores, amplicones y un esquema esquemático del protocolo de secuenciación.

5. Alineación y estadística

Las secuencias de HBV específicas del paciente se alinearon usando ClustalW Multiple Alignment en el software de análisis de secuencia BioEdit*.

35 * Hall, T.A. 1999. BioEdit: un programa de análisis y editor de alineación de secuencias biológicas fácil de usar para Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

40 Los nucleótidos en cada posición en cada paciente se compararon contra una secuencia de referencia específica de genotipo. Las secuencias usadas como referencia fueron A adw2 (X02763), Ba ad (D00330), C (AB033556), D ayw (X02496) y E (X75657) para los genotipos A, B, C, D y E, respectivamente. Las posiciones donde al menos tres o más mutaciones estaban presentes en todos los pacientes se utilizaron para un análisis posterior. En total se analizaron 503 posiciones usando tablas de frecuencias cruzadas y pruebas de Chi cuadrado para proporciones.

Se aplicó una corrección conservadora de Bonferroni para controlar las tasas de errores falsos positivos derivadas de múltiples pruebas, y por lo tanto se consideró que las asociaciones con un valor P de $< 9.9 \times 10^{-5}$ ($= 0.05/503$) eran estadísticamente significativas.

45 El análisis de asociación se realizó sobre la pérdida de HBsAg a un año de seguimiento libre de tratamiento (semana 96) en la población total del estudio. Además, se realizaron análisis de asociación sobre otros resultados del tratamiento (seroconversión de HBeAg, disminución de la SVR y HBsAg en la semana 24) en todos los pacientes combinados y en pacientes agrupados por ascendencia o genotipo viral por separado.

Resultados

Se encontró que una mutación de HBV estaba significativamente asociada con la pérdida de HBsAg en la semana 96 después de la corrección de Bonferroni para múltiples pruebas (figura 2). Esta mutación se produjo en 4 de 9 pacientes que alcanzaron la pérdida de HBsAg en la semana 96 y en ninguno de los pacientes que no perdieron HBsAg. La figura 2 también muestra otras mutaciones del HBV que están asociadas con el resultado del tratamiento de la hepatitis B, que son apropiadas para aumentar el valor predictivo. Por ejemplo, analizar la presencia de ya sea la mutación T784G o G1888W en combinación mejoró drásticamente la asociación (figura 2).

Discusión

La posición del nucleótido 784 está situada en el marco de lectura abierta (ORF) del gen S y polimerasa. En el S ORF, una mutación en esta posición provoca una sustitución de aminoácidos de serina (S) en arginina (R) (figura 2). Esta mutación en el genoma viral es, por lo tanto, un marcador de respuesta terapéutica.

Ejemplo 3

En el ejemplo 1 se identifica una fuerte asociación entre el alelo menor (G) de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y la pérdida de HBsAg en un año de seguimiento libre de tratamiento en estos pacientes. Este SNP, rs12356193, se encuentra en el cromosoma 10 en una región intrónica del gen SLC16A9. Curiosamente, se ha descrito que la presencia de este SNP está fuertemente asociada con los niveles de L-carnitina en otros estudios de GWA (Kolz et al., 2009). Sin embargo, ningún estudio informó un efecto de los niveles de L-carnitina en la pérdida de HBsAg en pacientes con hepatitis B crónica tratados con peginterferon y/o adefovir. Por lo tanto, nuestro objetivo fue determinar los niveles de L-carnitina en pacientes con CHB tratados con peginterferon y adefovir, y buscar asociaciones con el genotipo de rs12356193 y la pérdida de HBsAg.

Pacientes

Se seleccionó un subconjunto de 21 pacientes para la medición de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) (véase la sección de procedimientos).

Las características de referencia de los pacientes incluidos en este subconjunto se muestran en la tabla 1. En total, 2 pacientes tenían genotipo GG para SNP rs12356193, 10 pacientes genotipo AG y 9 pacientes genotipo AA. No hubo diferencias significativas en las características de referencia entre los pacientes con genotipo AG o GG y los pacientes con genotipo AA.

Tabla 1.

Características de referencia	Genotipo AG/GG	Genotipo AA	p
Número	12	9	
Edad media (años) (SD)	41 (7.3)	38 (6.7)	0.26
Sexo femenino (%)	0	0	
Ascendencia			
Caucásico (%)	8 (67)	4 (44)	0.40
Africano (%)	4 (33)	5 (56)	0.40
Mediana ALT (xULN) (iqr)	1.7 (0.8-5.2)	2.9 (1.9-5.0)	0.58
Características virales			
HBeAg positivo (%)	6 (50)	4 (44)	1.00
ADN de HBV medio (log10 UI/mL) (SD)	6.47 (2.0)	6.94 (2.0)	0.60
HBsAg medio (log10 IU/mL) (SD)	3.52 (1.2)	4.14 (0.7)	0.18
Genotipo del HBV			
A (%)	8 (67)	6 (67)	1.00
D (%)	3 (25)	2 (22)	1.00

E (%)	1 (8)	1 (11)	1.00
Resultado del tratamiento			
Pérdida de HBsAg	8 (67)	0	0.005

Procedimientos

5 Los niveles de L-carnitina y derivado de carnitina a partir de muestras de plasma de referencia se midieron en el departamento de trastornos metabólicos genéticos (GMZ) en el AMC mediante Espectrometría de Masas Tándem según un protocolo estandarizado.

La pérdida de HBsAg en este subconjunto se definió como niveles de HBsAg indetectables por Abbott AxSYM (HBsAg <0.05 UI/mL). Los niveles de L-carnitina y derivado de carnitina se muestran en micromol por ml y las diferencias de medias se probaron usando una prueba t no apareada. Los valores de P por debajo de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

10 Resultados

Los niveles medios de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) para diferentes genotipos de rs12356193 se representan en la figura 12 y en la tabla 2. Pacientes con rs12356193 genotipo AG o GG tenían niveles significativamente menores de C0, C2 y C3 que los pacientes con genotipo AA.

15 Niveles medios de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) para pacientes con pérdida de HBsAg a los 2 años de seguimiento libre de tratamiento y pacientes con persistencia de HBsAg a los 2 años de seguimiento libre del tratamiento se representan en la figura 13 y la tabla 2. Los pacientes con pérdida de HBsAg tuvieron niveles significativamente más bajos de C0, C2 y C3 que los pacientes con persistencia de HBsAg.

Tabla 2.

	Genotipo AG/GG	Genotipo AA	p
Número	12	9	
DL-carnitina media; C0 (µmol/ml) (SD)	30.4 (1.7)	40.1 (1.0)	<0.001
Acetil-L-carnitina media; C2 (µmol/ml) (SD)	2.9 (0.2)	4.0 (0.3)	0.004
propionil-L-carnitina media; C3 (µmol/ml) (SD)	0.33 (0.04)	0.50 (0.03)	0.003
	Pérdida de HBsAg	Persistencia de HBsAg	
Número	8	13	
DL-carnitina media; C0 (µmol/ml) (SD)	28.4 (1.9)	38.4 (1.3)	<0.001
Acetil-L-carnitina media; C2 (µmol/ml) (SD)	2.8 (0.2)	3.8 (0.2)	0.014
propionil-L-carnitina media; C3 (µmol/ml) (SD)	0.29 (0.03)	0.47 (0.03)	<0.001

20 Conclusión

25 En un GWAS de 84 pacientes con CHB tratados con peginterferon y adefovir, se identifica una fuerte asociación entre el alelo menor (G) de un SNP (rs12356193) y la pérdida de HBsAg. Se confirmó que los niveles de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) se asociaron significativamente con diferentes genotipos de rs12356193. Además, se demuestra que los pacientes con pérdida de HBsAg tenían niveles significativamente más bajos de C0, C2 y C3 que los pacientes con persistencia de HBsAg.

Ejemplo 4

En el ejemplo 3, se confirmó que los niveles de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) se asociaron significativamente con diferentes genotipos de rs12356193 y que los pacientes con pérdida de HBsAg tenían niveles significativamente menores de C0, C2 y C3 que los pacientes con persistencia de HBsAg.

5 En este ejemplo, se amplía la población de estudio a 84 pacientes y además se evalúan los niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0), acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) como predictores de pérdida de HBsAg y la asociación de los niveles de C0, C2 y C3 con la pérdida de HBsAg en una subpoblación de hombres no asiáticos.

Procedimientos (medición de carnitina por MS-MS)

10 Para evaluar las concentraciones de carnitina y derivados de carnitina en plasma, se usó un espectrómetro de masas Quattro II triple cuadrupolar (Micromass, Manchester, Reino Unido) en el modo de ionización por electroaspersión negativo (ESI) y el sistema de datos Micromass MassLynx con entrada de 50 microlitros en el laboratorio de Genetic Metabolic Disorders (AMC, Amsterdam, Países Bajos), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Chase et al., 1997).

Pacientes

Las características de referencia del paciente se indican en la tabla 3.

15 Tabla 3. Características de referencia de todos los pacientes HBeAg positivos y negativos incluidos en el análisis de GWAS.

Características	Población principal del estudio (n=84)		Pérdida de HBsAg (n=9)		Persistencia de HBsAg		p*
Demografía							
Edad media, años (SD)	39.5	(10.3)	44.9	(11.8)	38.9	(10.0)	0.10 ¹
Mujer, n (%)	21	(25)	1		20		0.44 ³
Etnia							0.18 ³
Caucásico, n (%)	27	(32)	5	(56)	22	(29)	
Africano, n (%)	26	(31)	3	(33)	23	(31)	
Asiático, n (%)	31	(37)	1	(11)	30	(40)	
Características del laboratorio							
Mediana ALT, xULN (iqr)	1.8	(1.1-3.2)	1.5	(0.8-4.0)	2.0	(1.1-3.2)	0.31 ²
HBeAg positivo, n (%)	40	(48)	4		36		1.00 ³
Media de ADN-HBV, log ₁₀ UI/mL (SD)	6.67	(1.73)	6.18	(2.22)	6.73	(1.67)	0.37 ¹
Media HBsAg, log ₁₀ IU/mL (SD)	3.78	(0.87)	3.30	(1.30)	3.84	(0.79)	0.25 ¹
Genotipo HBV							0.13 ³
A, n (%)	26	(31)	6	(67)	20	(27)	
B, n (%)	14	(17)	0	(0)	14	(19)	
C, n (%)	12	(14)	1	(11)	11	(15)	
D, n (%)	23	(27)	1	(11)	22	(29)	
E, n (%)	9	(11)	1	(11)	8	(11)	

Respuesta en la semana 96							
Pérdida de HBsAg, n (%)	9	(11)	-		-		
Respuesta combinada, n (%)	25	(30)	-		-		
Nivel de carnitina de referencia							
DL-carnitina (C0), $\mu\text{mol/ml}$ (SD)	-		31.1	(9.6)	37.3	(7.1)	0.02 ¹
Acetil-L-carnitina (C2), $\mu\text{mol/ml}$ (SD)	-		2.95	(0.81)	4.08	(1.09)	0.004 ¹
Propionil-L-carnitina (C3), $\mu\text{mol/ml}$			- 0.30	(0.08)	0.45	(0.18)	0.02 ¹

Resultados

1. Asociación de niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) con SNP rs12356193 y pérdida de HBsAg

5 El SNP rs12356193 está situado en el cromosoma 10 en una región intrónica del gen SLC16A9. Se informa que este SNP está fuertemente asociado con los niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) en otros estudios de GWAS (Kolz et al., 2009) ($\beta=3.58$, $p=4.0 \times 10^{-26}$). Esta asociación se confirmó en nuestra cohorte de estudio completa ($n=84$), ya que los niveles plasmáticos medios de DL-carnitina (C0) fueron significativamente diferentes en pacientes con el genotipo GG, AG y AA (26.3 frente a 33.7 frente a 37.7 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, $p=0.02$, figura 14a y tabla 3). Los niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) también fueron inferiores en los pacientes con pérdida de HBsAg en la semana 96, que los pacientes con persistencia de HBsAg (31.1 frente a 37.3 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.02$, figura 14b). Los datos de los resultados del tratamiento en todos los pacientes tratados en nuestro estudio hasta 2 años después del final del tratamiento (semana 144) están disponibles. Los niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) también fueron más bajos en los pacientes con pérdida de HBsAg en la semana 144, que en los pacientes con persistencia de HBsAg (32.2 frente a 37.4 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.02$, figura 14c).

15 2. Niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) como predictor de pérdida de HBsAg en la semana 96

La discriminación de las variables definidas como la capacidad de distinguir pacientes que lograrán la pérdida de HBsAg en la semana 96 de aquellos que no lo harán, se evaluó mediante el área bajo el análisis de la curva característica del operador receptor (AUC).

20 La figura 15 muestra la AUC para la predicción de la pérdida de HBsAg en la semana 96, que fue de 0.75 (CI del 95%, 0.54-0.96; $p=0.01$). Usando los niveles de referencia de DL-carnitina (C0) de $\leq 33.31 \mu\text{mol/L}$ como punto de corte, el valor predictivo positivo (PPV) fue del 24% y el valor predictivo negativo (NPV) del 96% con una sensibilidad del 78% y especificidad del 71%.

3. Subanálisis de los niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) en hombres no asiáticos

25 Se sabe que varios factores influyen en el nivel de DL-carnitina plasmática (C0), por ejemplo, ingesta dietética, sexo, edad y enfermedad ((Cederblad et al. 1976; Cederblad et al 1987; Flanagan 2010). En nuestra cohorte, el nivel de DL-carnitina (C0) varió significativamente en pacientes de diferente sexo y etnia (figura 16).

30 Dado que la etnia y el sexo parecían ser factores de confusión para los niveles de DL-carnitina (C0) en nuestro estudio, además del hallazgo de muy baja prevalencia del SNP favorable en los asiáticos, se decide evaluar más a fondo la asociación de los niveles de DL-carnitina (C0) y pérdida de HBsAg en una subpoblación de hombres no asiáticos ($n=44$).

4. Asociación de niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) con SNP rs12356193 y pérdida de HBsAg en hombres no asiáticos

35 En general, el nivel medio de referencia de DL-carnitina (C0) en pacientes hombres no asiáticos fue de 36.5 $\mu\text{mol/L}$ (SD 7,0). En hombres no asiáticos, los niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) fueron significativamente diferentes en pacientes con el genotipo GG, AG y AA (26.3 frente a 33.7 frente a 38.5 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, $p=0.01$, figura 17a).

- Además, los niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) fueron inferiores en hombres no asiáticos con pérdida de HBsAg en la semana 96 que aquellos con persistencia de HBsAg (28.4 frente a 38.3 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, $p < 0.001$, figura 17b). Es de destacar que todos los pacientes no asiáticos con pérdida de HBsAg eran hombres ($n=8$) lo que hizo imposible un subanálisis de la asociación de los niveles de DL-carnitina (C0) y la pérdida de HBsAg en mujeres no asiáticas.
- 5
5. Niveles plasmáticos de DL-carnitina (C0) como predictor de pérdida de HBsAg en la semana 96 en hombres no asiáticos
- La figura 18 muestra la AUC para la predicción de la pérdida de HBsAg, que fue de 0.75 (CI del 95%, 0.54-0.96; $p=0.01$). Usando niveles de referencia de DL-carnitina (C0) $\leq 33.31 \mu\text{mol/L}$ como punto de corte, el valor predictivo positivo (PPV) fue del 50% y el valor predictivo negativo (NPV) del 97% con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 81%.
- 10
6. Asociación de niveles plasmáticos de acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) con SNP rs12356193 y pérdida de HBsAg
- La acetil-L-carnitina (C2) y la propionil-L-carnitina (C3) son dos ésteres de DL-carnitina (C0) y también se miden por el mismo procedimiento de espectrometría de masas en Tándem. Se encontraron asociaciones similares con SNP rs12345193 y pérdida de HBsAg como con DL-carnitina (C0) para estos dos ésteres.
- 15
- Los niveles plasmáticos de acetil-L-carnitina en plasma fueron significativamente diferentes en pacientes con el genotipo GG, AG y AA (2.49 frente a 3.51 frente a 4.10 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente, $p=0.03$, figura 19a), sin embargo, esta asociación no fue significativa para el nivel de propionil-L-carnitina (0.30 frente a 0.42 frente a 0.44 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, $p=0.50$, figura 19b).
- 20
- Los niveles de acetil-L-carnitina en plasma también fueron inferiores en pacientes con pérdida de HBsAg en la semana 96, que en pacientes con persistencia de HBsAg (2.95 frente a 4.08 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.004$, figura 20a y tabla 3). Se encontró la misma asociación para el nivel de propionil-L-carnitina en plasma (0.30 frente a 0.45 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.02$, figura 21a y tabla 3). Los pacientes con pérdida de HBsAg en la semana 144 también tuvieron niveles significativamente más bajos de acetil-L-carnitina (C2) (3.22 frente a 4.09 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.009$, figura 20b), y propionil-L-carnitina (C3) (0.32 frente a 0.46 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.009$, figura 21b).
- 25
7. El nivel de acetil-L-carnitina (C2) en plasma y propionil-L-carnitina (C3) como predictor de pérdida de HBsAg en la semana 96
- La figura 22a muestra la AUC para la predicción de la pérdida de HBsAg en la semana 96 usando acetil-L-carnitina (C2), que era 0.80 (CI del 95%, 0.65-0.94, $p=0.003$). Usando niveles de referencia de acetil-L-carnitina (C2) de $\leq 3.89 \mu\text{mol/L}$ como punto de corte, el valor predictivo positivo (PPV) fue del 19% y el valor predictivo negativo (NPV) del 98% con una sensibilidad del 89% y una especificidad del 53%.
- 30
- La figura 22b muestra la AUC para la predicción de la pérdida de HBsAg en la semana 96 de propionil-L-carnitina (C3), que fue 0.78 (CI del 95%, 0.64-0.92, $p=0.006$). Usando niveles de referencia de propionil-L-carnitina (C3) de $\leq 0.43 \mu\text{mol/L}$ como punto de corte, el valor predictivo positivo (PPV) fue del 18% y el valor predictivo negativo (NPV) del 100% con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 47%.
- 35
8. Subanálisis de los niveles plasmáticos de acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3) en hombres no asiáticos
- El subanálisis de hombres no asiáticos no cambió la significación de los hallazgos en acetil-L-carnitina (C2) y propionil-L-carnitina (C3), como se muestra en las figuras 23 y 24.
- 40
- Referencias
- Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403
- Aulchenko YS, Ripke S, Isaacs A, van Duijn CM. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* (2007) 23 (10): 1294-1296
- Cederblad G. Plasma DL-Carnitine (C0) and body composition. *Clin Chim Acta*. 1976 Mar 1;67(2):207-12
- 45
- Cederblad G. Effect of diet on plasma DL-Carnitine (C0) levels and urinary DL-Carnitine (C0) excretion in humans. *Am J Clin Nutr*. 1987 Apr;45(4):725-9
- Chace DH, et al. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 1997 Nov;43(11):2106-13

Dienstag J.L. N Engl J Med 2008, 359; 1486-1500

Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983

Flanagan JL, et al. Role of DL-Carnitine (C0) in disease. Nutr Metab (Lond). 2010 Apr 16;7:30. doi: 10.1186/1743-7075-7-30

5 Galibert F, et al. Nature. 1979 Oct 25;281(5733):646-50.)

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98

Kolz M et al. Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. PLoS Genet. 2009 Jun;5(6):e1000504.

10 Needleman 1970, J Mol Biol 48; 443; Smith 1981, Adv Appl Math 2, 482 Takkenberg, R.B.. Thesis University of Amsterdam (2011) The Netherlands. Chapter 2, ISBN 9789090263045

Wiley, John & Sons, Current Protocols in Molecular Biology N.Y (1989), 6.3.1-6.3.6

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para determinar si un paciente con hepatitis B tiene una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si una muestra que contiene ácido nucleico de dicho paciente con hepatitis B comprende el alelo G de SNP rs12356193.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho resultado positivo se selecciona del grupo que consiste en pérdida de HBsAg, pérdida de HBsAg con seroconversión anti-HBs, respuesta virológica sostenida y una disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la sangre de dicho paciente en o antes de la semana 24 de terapia.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende determinar el SNP rs12356193 en combinación con al menos un otro SNP como se representa en la figura 1 y/o la figura 2.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además determinar si el nivel de expresión de carnitina en una muestra de plasma de dicho paciente con hepatitis B es igual o inferior a 33.3 micromol/litro, preferiblemente igual o inferior a 29 micromol/litro, que es indicativo para un respondedor, o más de 33.3 micromol/litro, que es indicativo para un no respondedor.
- 15 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además determinar si el nivel de expresión de acetil-L-carnitina en una muestra de plasma de dicho paciente con hepatitis B es igual o inferior a 3.89 micromol/litro, lo que es indicativo de un respondedor, o más de 3.89 micromol/litro, que es indicativo para un no respondedor.
- 20 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además determinar si el nivel de expresión de propionil-L-carnitina en una muestra de plasma de dicho paciente con hepatitis B es igual o inferior a 0.43 micromol/litro, lo que es indicativo de un respondedor, o más de 0.43 micromol/litro, que es indicativo para un no respondedor.
- 25 7. Interferón, opcionalmente en combinación con un inhibidor de la ADN polimerasa viral, para uso en un procedimiento para tratar la hepatitis B, caracterizado porque se trata a un paciente con hepatitis B que ha dado positivo para el alelo G del SNP rs12356193.
8. Interferón para uso en un procedimiento para tratar la hepatitis B según la reivindicación 7, en el que se trata a un paciente con hepatitis B que ha dado positivo para el alelo G del SNP rs12356193, en combinación con al menos un otro alelo del SNP asociado al resultado positivo como se representa en la figura 1 y/o la figura 2.
- 30 9. Un procedimiento para determinar si un individuo tiene una predisposición genética para una mejor probabilidad de un resultado positivo del tratamiento de hepatitis B, en comparación con la población media de pacientes con hepatitis B, que comprende determinar si el ácido nucleico genómico de dicho individuo comprende al menos el alelo G del SNP rs12356193.
- 35 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 9, que comprende además determinar si dicho individuo tiene un contenido de referencia de HBsAg de menos de 387 UI/mL antes del inicio del tratamiento de la hepatitis B.

Figura 1a

Análisis GWA para "pérdida de HBsAg en la semana 96 en todos los pacientes"

Nr	SNP	Cro	Posición	A1	A2 ¹ : pos. alelo	A2 ¹ freq	In HWE ² ?	effB ³	P1df ⁴
1	rs12356193	10	61083359	A	G	0.113	SI	9.51	2.61E-09
2	rs11574	1	23758085	G	A	0.060	SI	16.66	7.93E-08
3	rs7094971	10	61119570	A	G	0.113	SI	7.68	1.92E-07
4	rs9654	19	7893801	A	C	0.065	NO	9.64	3.20E-07
5	rs2184019	9	35269835	C	A	0.107	NO	7.05	3.50E-07
6	rs16962380	16	13570180	G	A	0.107	NO	7.05	3.50E-07
7	rs525413	6	94912769	G	A	0.119	SI	7.20	4.31E-07
8	rs12214948	6	66690324	G	A	0.143	NO	5.47	4.47E-07
9	SNP6-66700749	6	66700749	A	C	0.143	NO	5.47	4.47E-07
10	rs17241543	16	58802997	G	A	0.226	SI	5.62	7.39E-07

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo² HWE = Equilibrio de Hardy Weinberg³ effB = Razón OR para el efecto del alelo de resultado positivo (A2)⁴ P1df = Valor p para prueba de tendencia Cochran-Armitage (1 grado de libertad)

Análisis GWA para "disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la semana 24 en todos los pacientes"

Nr	SNP	Cromosoma	Posición	A1	A2 ¹ : pos. alelo	P1df ²
1	rs17021751	4	147799301	A	G	7,93E-08
2	rs12603409	17	78532184	A	G	7,93E-08
3	rs6471876	8	61466775	C	A	2,85E-07
4	rs13254748	8	61536151	G	A	2,85E-07
5	rs4484658	8	96277902	G	A	6,66E-07

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo² P1df = Valor p para prueba de tendencia Cochran-Armitage

ES 2 657 266 T3

Análisis GWA para "respuesta viral sostenida en el seguimiento a largo plazo (2 años) en todos los pacientes"

Nr	SNP	Cromosoma	Posición	A1	A2 ¹ : pos. alelo	P1df ²
1	rs4900084	14	91172685	A	G	4.07e-07
2	rs10137809	14	91208785	G	A	5.09e-07
3	rs1252202	8	85633006	A	G	1.76e-06
4	rs3802279	8	54303501	G	A	3.13e-06
5	rs7817710	8	54305368	C	A	3.13e-06

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo

² P1df = Valor p para prueba de tendencia Cochrane-Armitage

Análisis GWA para "disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la semana 24 en pacientes con genotipo A, D, o E"

Nr	SNP	Cromosoma	Posición	A1	A2 ¹ : pos. alelo	N	P1df ²
1	rs6009408	22	47847768	A	G	58	7.42E-09
2	rs11574	1	23758085	G	A	58	4.81E-08
3	rs2730361	3	16063480	C	A	58	8.79E-08
4	rs10904546	10	747222	A	G	58	5.48E-07
5	rs12949063	17	76704933	A	G	58	5.52E-07

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo

² P1df = Valor p para prueba de tendencia Cochrane-Armitage

Análisis GWA para "pérdida de HBsAg en la semana 96 en pacientes con genotipo A, D, o E"

Nr	SNP	Cromosoma	Posición	A1	A2 ¹ : pos. alelo	N	P1df ²
1	rs12356193	10	61083359	A	G	58	1.74E-07
2	rs11574	1	23758085	G	A	58	5.60E-07
3	rs7022122	9	2614186	A	G	58	1.42E-06
4	rs17241543	16	58802997	G	A	58	1.87E-06
5	rs7094971	10	61119570	A	G	58	6.28E-06

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo

² P1df = Valor p para prueba de tendencia Cochrane-Armitage

Figura 1b

Análisis GWA para "pérdida de HBsAg en la semana 96 en todos los pacientes"

Nr	SNP	Cro	Posición	Gen más cercano	A2 ¹ : pos. alelo	Secuencias flanqueantes que indican posición [SNP] con los alelos mostrados en los corchetes
1	rs12356193	10	61083359	SLC16A9	G	TTTCTTTTGTACAAAATCTGTGCTACT [A/G] TTACAATCTGGACCTCTATAICTGG
2	rs11574	1	23758085	ID3	A	TTTCCTCTAATCAGACAGCCGAGCTC [A/G] CTCCGGAAC TTGTCATCTCCAACGA
3	rs7094971	10	61119570	SLC16A9	G	ACTTGGTTCCATT TGGGACAAAAGGTA [A/G] AGCTGAGGA ATATTGTTGATGACCA
4	rs9654	19	7893801	SNAPC2	C	GGGGGTTCCATT TCTGAGACCCCAA [A/C] GTATGGGGC ATCTTAGAGGCCCGCC
5	rs2184019	9	35269835	UNC13B	A	CTCTGCAATATAATTTTGTAGGAAGG [C/T] TGACTATTC CTAAAAGCTAAGGAAA
6	rs16962380	16	13570180	SHISA9/ERCC4	A	TACAGATGTGACCTCCAGAACAGACA [C/T] TGTTTTTGT CACTAGCATTIATCT
7	rs525413	6	94912769	TSG1	A	GCTAGGACTTGGCCTTCTTTAAGACA [C/T] CTTCTCAGG CTCGTCTGTGAGAAC
8	rs12214948	6	66690324	EYS	A	ACTCAAATGTTTTCTTCTCTGTACT [A/G] TAAGAATGT TGAGATCTATACTTGT
9	SNP6-66700749	6	66700749	EYS	C	-
10	rs17241543	16	58802997	GOT2/CDH8	A	ACTTCTCATCACCCAGACTCATATCA [A/G] TGTTCACA TCTATCTAGAATAGTT

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo: "seroconversión de HBsAg en la semana 96"

*Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, refSNP.

Análisis GWA para "disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la semana 24 en todos los pacientes"

Nr	SNP	Cro	Posición	Gen más cercano	A2 ¹ : pos. alelo	Secuencias flanqueantes que indican posición [SNP] con los alelos mostrados en los corchetes
1	rs17021751	4	147799301	TTC29/SLC10A7	G	TGAATGACATAAGAATGACCAGTCAT [C/T] GTTCTGGCA GAGGCAGCAGGCCTTT
2	rs12603409	17	78532184	B3GNTL1	G	TGTTTGAAGGAACTTGTAACAAAAG [A/G] CTCTCCAG CTTTATCTTTCAGAAT
3	rs6471876	8	61466775	CA8/RAB2A	A	GAAGTTACTTTAAAAGTGTGTTGGGA [G/T] Atttttttag aggtcttgctctgttg
4	rs13254748	8	61536151	CA8/RAB2A	A	CTGCTCATTTCAGTAAACCTTCTTGC [A/G] TCCCCTAAG TTCTCAATGGAATAAC
5	rs4484658	8	96277902	PLEKHF2/C8orf 37	A	GCCACTGAACTTGTGTTTCTTGGAGAT [C/T] TGACTCGTT GCCATCAGCAACATGG

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo: "disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la semana 24"

*Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, refSNP.

Análisis GWA para "respuesta viral sostenida en el seguimiento a largo plazo (2 años) en todos los pacientes"

Nr	SNP	Cro	Posición	Gen más cercano	A2 ¹ : pos. alelo	Secuencias flanqueantes que indican posición [SNP] con los alelos mostrados en los corchetes
1	rs4900084	14	91172685	CATSPERB	G	AAAGCCCATATCTGGAGGCTGGAAC [A/G] GAGAAAAGA AAATATTATATTAAA
2	rs10137809	14	91208785	CATSPERB	A	TTTCCATTTTCATCAAAATGAATGA [C/T] GACCAGGTG AGAAATCTCTAAAGTG
3	rs1252202	8	85633006	RALYL	G	TTTCCTTAATAAGGCTTATTCCTTTA [C/T] AAGAATTGT GCTTTTCCTTTATATT
4	rs3802279	8	54303501	OPRK1	A	ATTCAGGGAGTCTGAAAGAGATCATG [C/T] CATGACTAA TTCCAGCAAAATGTC
5	rs7817710	8	54305368	OPRK1	A	AAAGCTAATGTCTATTGTAATAAAT [G/T] ACTAAATAT TTCAAATCTAGCCACT

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo: "respuesta viral sostenida en el seguimiento a largo plazo (2 años)"

*Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, refSNP.

Análisis GWA para "disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la semana 24 en pacientes con genotipo A, D, o E"

Nr	SNP	Cro	Posición	Gen más cercano	A2 ¹ : pos. allele	Secuencias flanqueantes que indican posición [SNP] con los alelos mostrados en los corchetes
1	rs6009408	22	47847768	FAM19A5/C22orf34	G	CATGGAGGACGCAATCATGGCATTTC [C/T] CCCTTAAAA GCACGAGGACCCATT
2	rs11574	1	23758085	ID3	A	TTTCCTCTAATCAGACAGCCGAGCTC [A/G] CTCGGGAAC TTGCATCTCCAACGA
3	rs2730361	3	16063480	ANKRD28/GALNTL2	A	ATAAATTCATGCTTTG [G/T] GGAGAGTATACTGAAAATG GAGAGT
4	rs10904546	10	747222	DIP2C/LARP4B	G	AAGCAGCTTTCTTGAAAATCCCTGT [A/G] GGTGCGTGG AGTGTAGGTTTAGATA
5	rs12949063	17	76704933	TRIM25	G	TCCCCACCGTCCCCTAGCAGCGCT [A/G] GTTATATTG TGGCCAAACCTTTAAA

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo: "disminución de más de 1.5 log de HBsAg en la semana 24"

*Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, refSNP.

Análisis GWA para "seroconversión de HBsAg en la semana 96 en pacientes con genotipo A, D, o E"

Nr	SNP	Cro	Posición	Gen más cercano	A2 ¹ : pos. allele	Secuencias flanqueantes que indican posición [SNP] con los alelos mostrados en los corchetes
1	rs12356193	10	61083359	SLC16A9	G	TTTCTTTGTACAAATCTGTGCTACT [A/G] TTACAATCT GGACCCTATATCTGG
2	rs11574	1	23758085	ID3	A	TTTCCTCTAATCAGACAGCCGAGCTC [A/G] CTCGGGAAC TTGCATCTCCAACGA
3	rs7022122	9	2614186	VLDLR	G	ATCCTTTTCACTTTGTACATGTGAA [A/G] TATTTGACA TGCCATGAACAATGGA
4	rs17241543	16	58802997	GOT2/CDH8	A	ACTTCTCATCCCCAGACTCATATCA [A/G] TGTTCACA TCTATCTAGAATAGTT
5	rs7094971	10	61119570	SLC16A9	G	ACTTGGTTCCATTTGGGACAAAGGTA [A/G] AGCTGAGGA ATATTGTTGATGACCA

¹ A2 = Alelo de SNP asociado con resultado positivo: "seroconversión de HBsAg en la semana 96"

*Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, refSNP.

Figura 2a

Análisis asociación SNP viral para "pérdida de HBsAg en la semana 96"

Nr	Posición	Ref	POS nt ²	seroconversión de HBsAg			Sin seroconversión de HBsAg			ChiCua ⁵
				POS nt ³	Total ⁴	%	POS nt ³	Total ⁴	%	
1	784	T	G	4	9	44.4	0	75	0.0	3.30E-09
2	1135	A/C	H	4	9	44.4	8	75	10.7	6.21E-03
3	2088	G	Y	2	9	22.2	2	75	2.7	9.24E-03
4	1888	G	W	2	9	22.2	2	75	2.7	9.24E-03
5	2150	C/T	K	2	9	22.2	2	74	2.7	9.83E-03
6	2600	G/A	A	3	8	37.5	6	67	9.0	1.89E-02
7	128	G/T	K	3	9	33.3	6	75	8.0	2.02E-02
8	2684	C/A	H	4	8	50.0	12	72	16.7	2.53E-02
9	1766	C	D	3	9	33.3	6	71	8.5	2.60E-02
10	97	G	A	2	9	22.2	3	75	4.0	2.90E-02

¹Posición = Nomenclatura de posiciones de nucleótidos según Galibert et al.

² POS nt = polimorfismos de nucleótidos asociados con resultados positivos según código de nucleótidos IUPAC

³ POS nt = número de pacientes con polimorfismo de nucleótidos asociado con resultados positivos

⁴ Total = número de pacientes en análisis para la posición correspondiente

⁵ChiCua=valor p para prueba Chi-cuadrado para proporciones (1 grado de libertad)

Figura 2b

Análisis de combinaciones de SNP viral en asociación con "pérdida de HBsAg en la semana 96"

Combinaciones				seroconversión de HBsAg			Sin seroconversión de HBsAg			ChiCua ⁴
Nr	Posición ¹	Nr	Posición ¹	POS nt ²	Total ³	%	POS nt ²	Total ³	%	
1	784	4	1888	6	9	66.7	2	75	2.7	6.39E-10
1	784	10	97	6	9	66.7	3	75	4.0	9.27E-09
1	784	8	2684	8	9	88.9	12	75	16.0	1.23E-06
1	784	9	1764	6	9	66.7	6	75	8.0	2.01E-06
1	784	2	1135	6	9	66.7	8	75	10.7	2.05E-05

¹Posición = Nomenclatura de posiciones de nucleótidos según Galibert et al.

²POS nt = número de pacientes con ya sea uno de los polimorfismos de nucleótidos asociados con resultados positivos.

³Total = número de pacientes en análisis para combinación correspondiente.

⁴ChiCua = valor p para prueba Chi-cuadrado para proporciones (1 grado de libertad).

Figura 3

Gráfico Manhattan: Prueba de Cochrane-Armitage para pérdida de HBsAg en la semana 96.
 SNP rs12356193 se representa en el círculo. El límite para la significancia amplia del genoma ($p < 6.3 \times 10^{-8}$) se muestra como una línea punteada

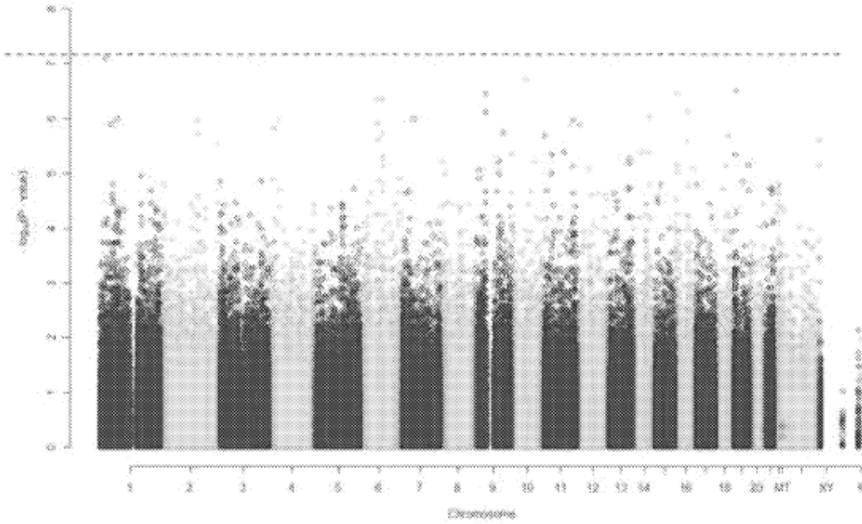


Figura 4

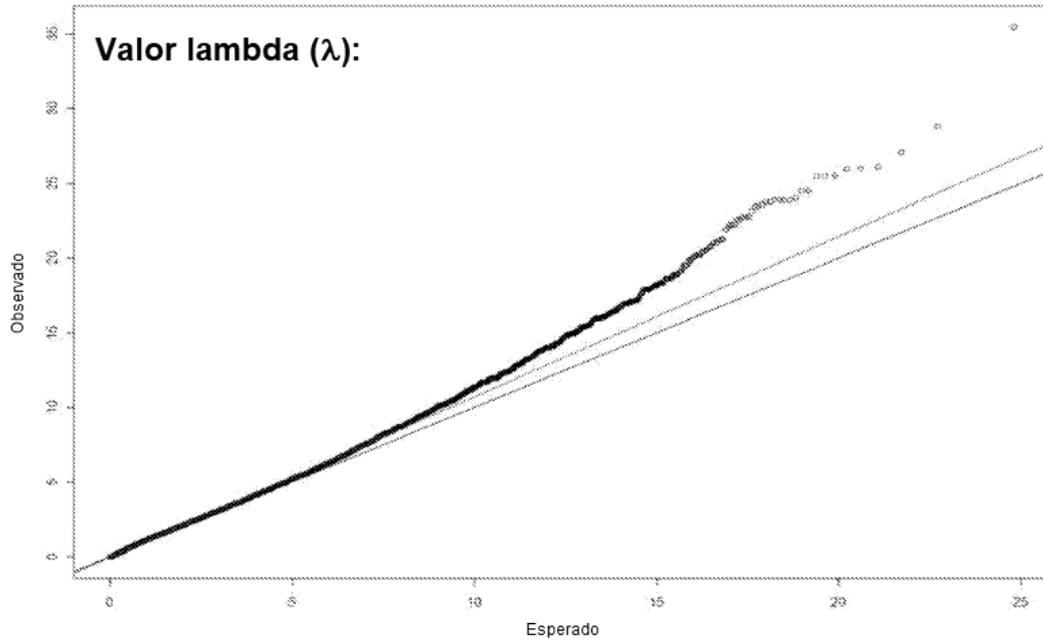


Gráfico Q-Q de pérdida de HBsAg en la semana 96

Figura 5

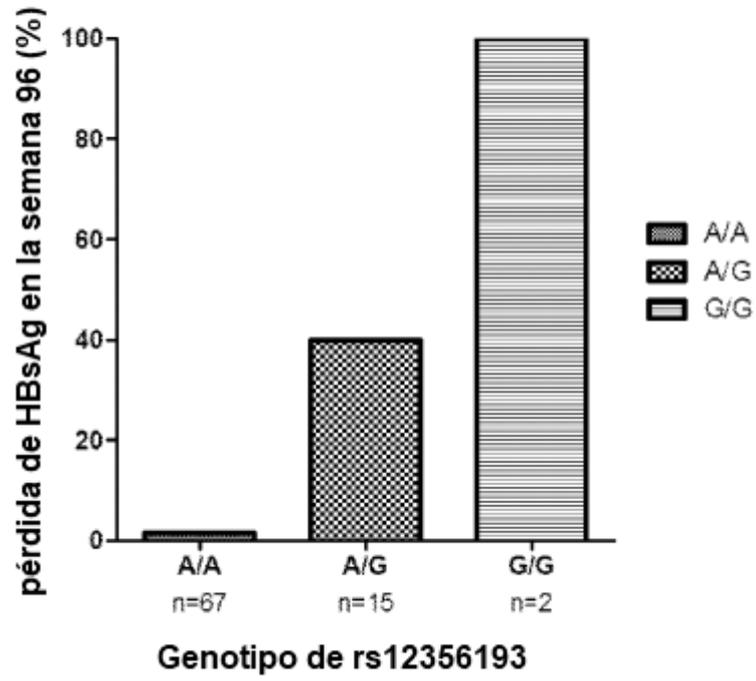


Figura 6

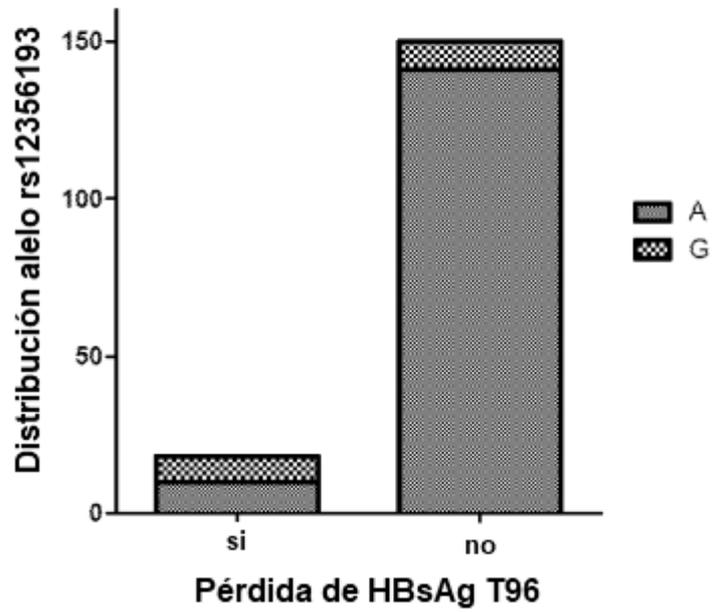
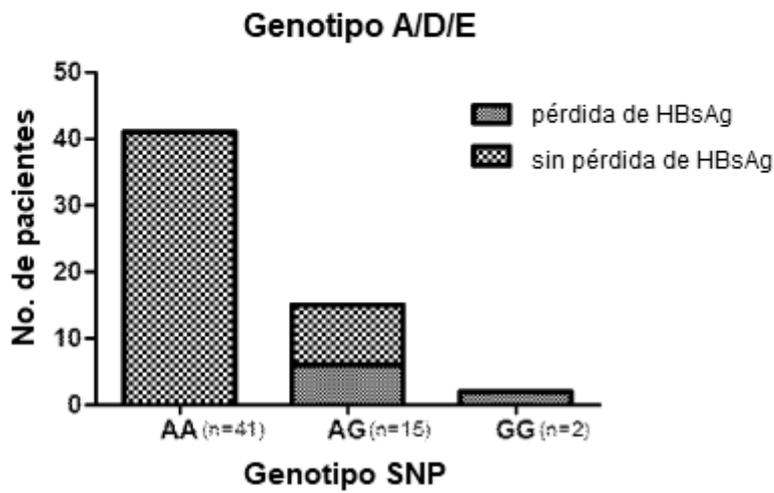


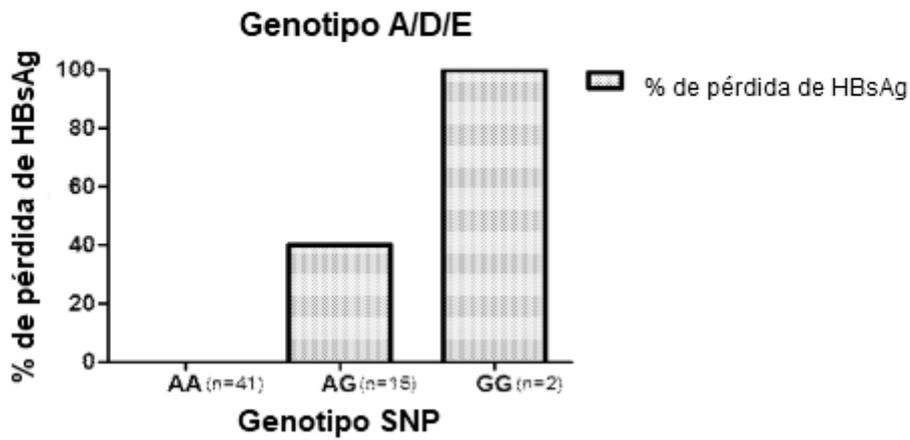
Figura 7

a. Distribución de genotipos de rs12356193 entre pacientes con genotipo viral A, D y E, según pérdida de HBsAg en la semana 96



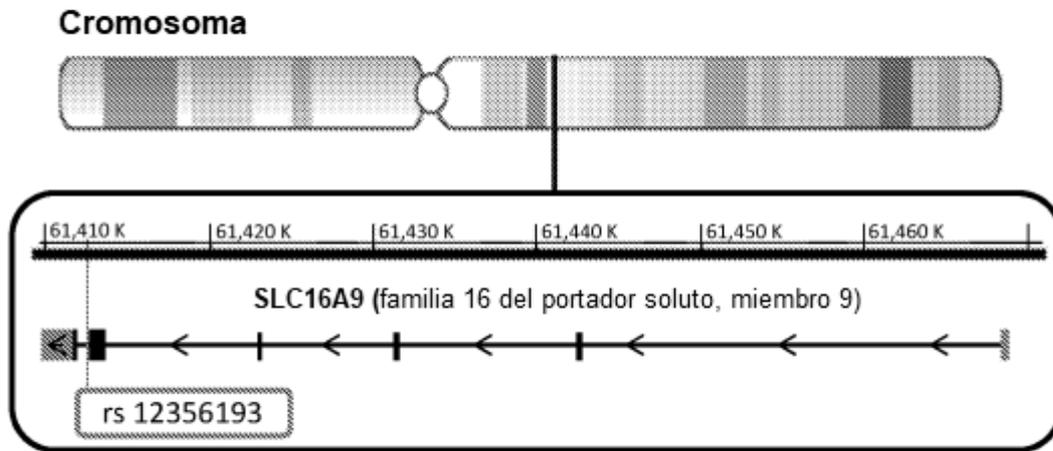
a.

b. Porcentaje de pérdida de HBsAg en la semana 96 en diferentes genotipos de rs12356193 en pacientes con genotipo viral A, D y E.



b.

Figura 8



*Fuente: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=12356193, GeneView.

Figura 9

Hacia adelante	Reverso	Longitud amplicón
P1	P28	397
P29	P12	266
P6	P22	409
P23	P13	322
P7	P21	300
P18	P14	346
P8	P24	374
P25	P15	370
P9	P27	473
P26	P16	398
P10	P30	281
P31	P2	402
P1	P2	3,185

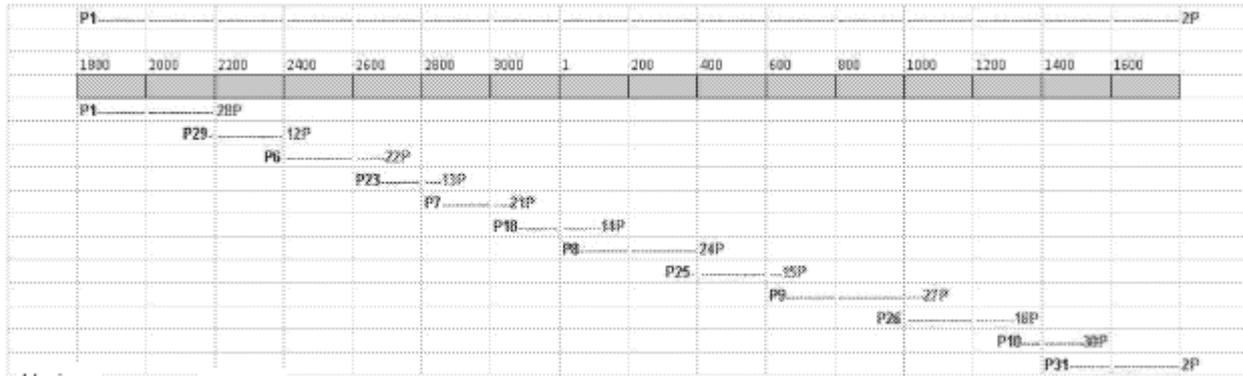
Figura 10

Inicio	Parada	Etiqueta	Secuencia
1821	1841	P1	TTTTTSAMYTYTGCCTARTCA
1823	1806	P2	AAAAAGTTRCATGRTGVYGG
2357	2380	P6	BGCAGGWCCCCTAGAAGAAGAACT
2812	2823	P7	GYGGRTCACCHTATTCTTGGG
67	90	P8	CTCCAGTTCMGGAACASTVARCCC
634	656	P9	ATWCCTATGGGAGTGGGCCTCAG
1266	1286	P10	CCATACTGCGGAACTCCTAGC
2400	2381	P12	CTKCGTCTGCGAGGCGAGGG
2955	2935	P13	GGRTTGWRGTCCCAATCTGG
202	179	P14	CTGTAACACGAGAAGGGGTCCYAG
737	716	P15	ATARCTRAAAGCCARACAGTGGG
1394	1372	P16	GCAGYACARCCTAGCAGCCATGG
3039	3061	P18	GGGGTGGAGCCCTCAGGCTCARG
2765	2740	P22	CTTCCAWAGAGTRTGTAATAATRTC
3111	3091	P21	GCGATTGGTDGATGCAGGAGG
2634	2656	P23	RTYATGCCTGCTAGGTTTTATCC
440	418	P24	CCAAYAAGAAGATGAGGCATAGC
368	387	P25	TATCGCTGGATGTGTCTGCG
997	1019	P26	ATTGTGGGTCTTYTGGGYTTTGC
1106	1086	P27	GTTGGCGAGAAAAGTRAAAGCC
2217	2191	P28	GAWATRTGAAACCACAATARTTYCTG
2135	2156	P29	CCARCATCCAGGGAHYTAGTAG
1547	1527	P30	GAGWCCGCGTAAAGAGAGGTG
1420	1439	P31	TTTGTYTACGTCCCGTCRGC

Nucleótidos degenerados son según el código de nucleótidos IUPAC. Por consiguiente:

S significa G o C
M significa A o C
Y significa C o T
R significa A o G
W significa A o T
K significa G o T
V significa A o C o G
B significa C o G o T
H significa A o C o T
D significa A o G o T

Figura 11



Hacia adelante	Reverso	Longitud amplicón
P1	P28	397
P29	P12	266
P6	P22	409
P23	P13	322
P7	P21	300
P18	P14	346
P8	P24	374
P25	P15	370
P9	P27	473
P26	P16	398
P10	P30	281
P31	P2	402
P1	P2	3185

Figura 12

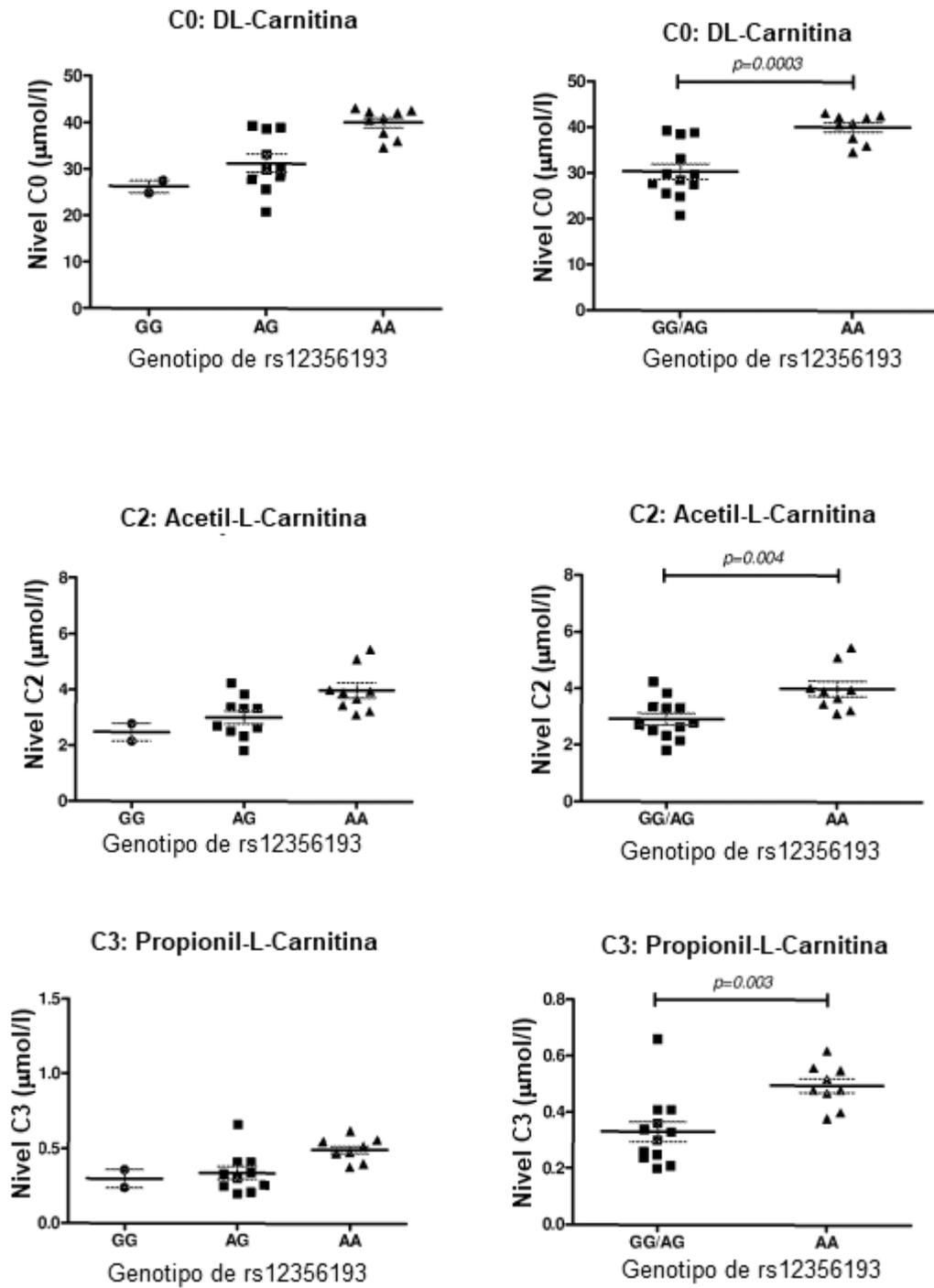


Figura 13

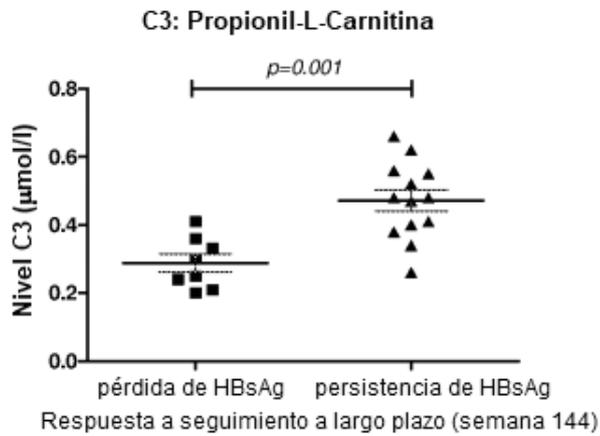
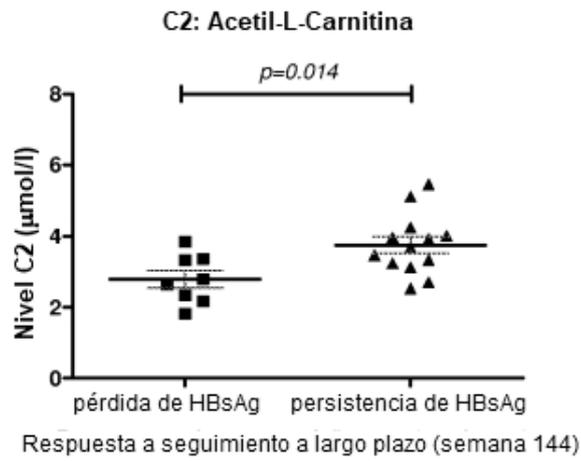
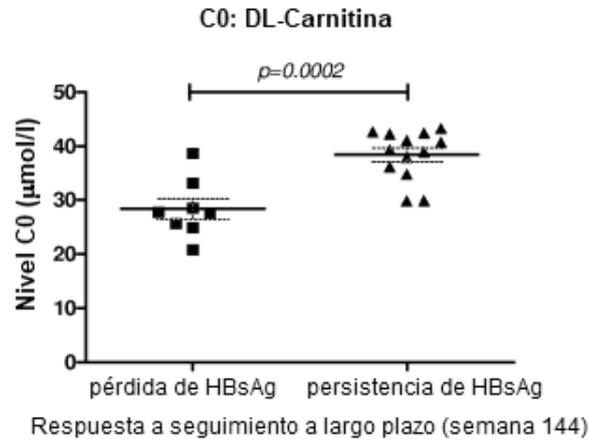
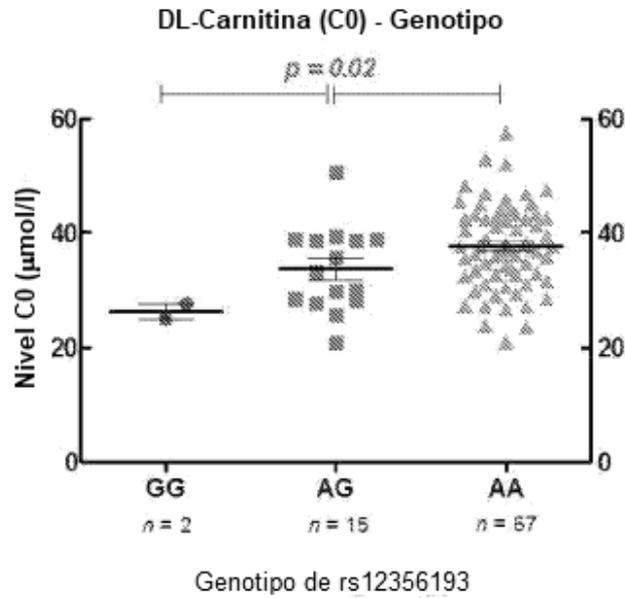
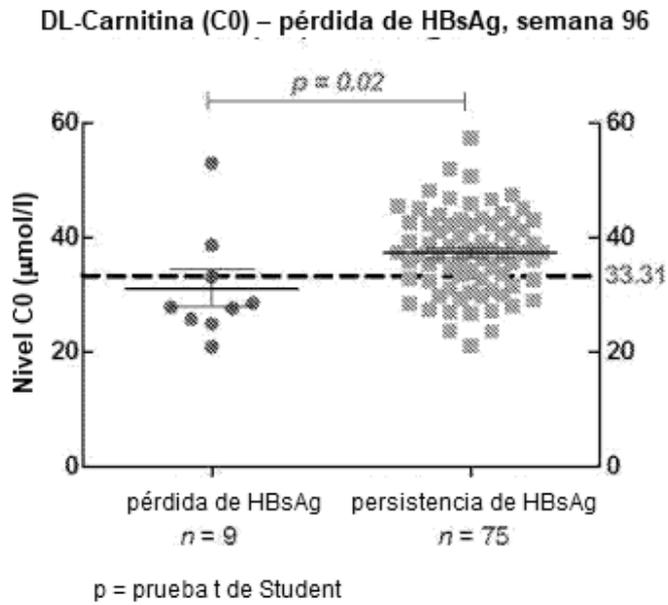


Figura 14



p = ANOVA de una vía para la diferencia entre todos los grupos

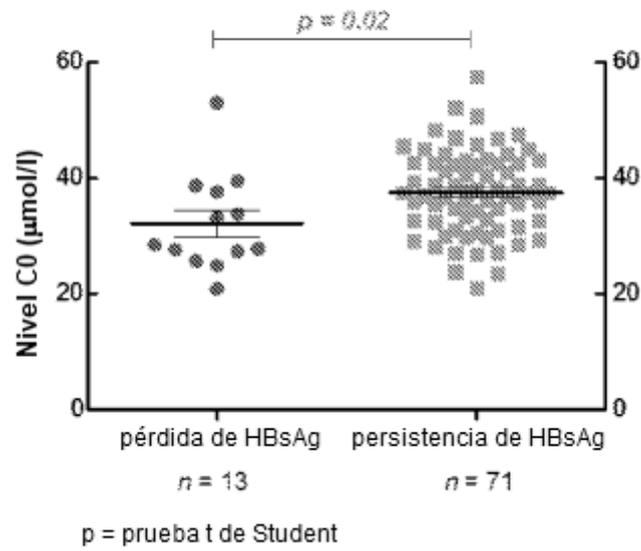
a.



b.

Continuación Figura 14

DL-Carnitina (C0) – pérdida de HBsAg, semana 144



c.

Figura 15

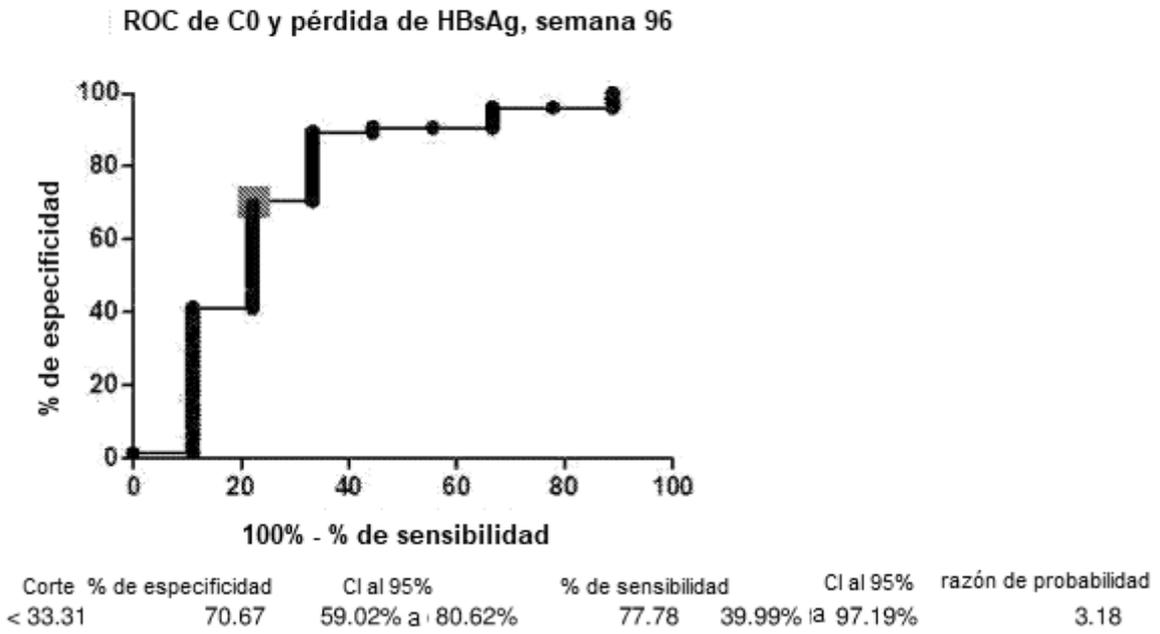


Figura 16

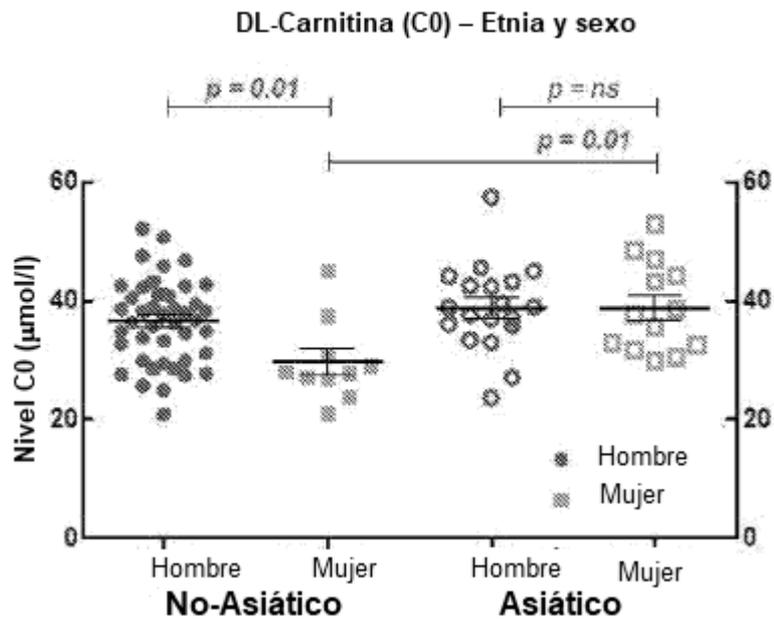
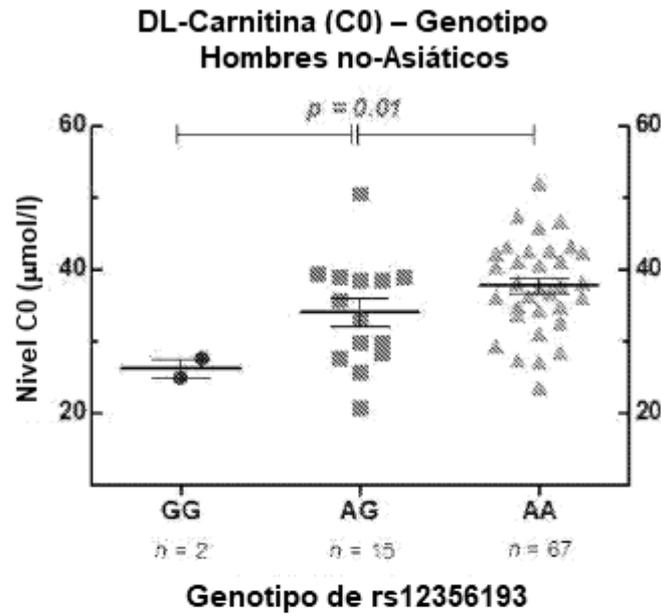
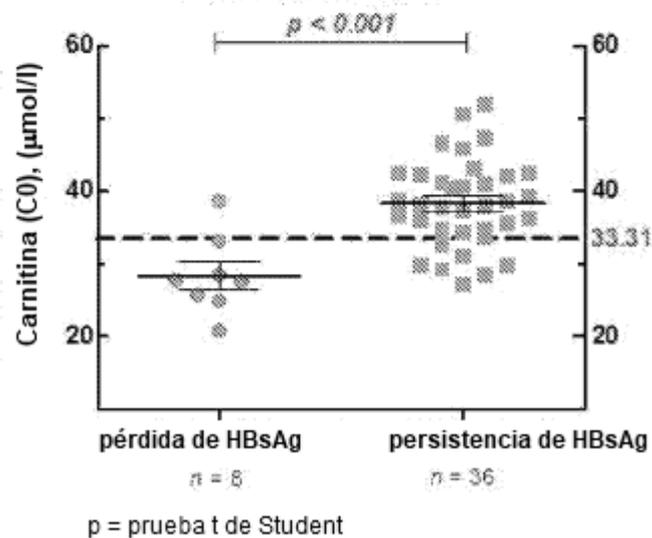


Figura 17



a.

**DL-Carnitina (C0) – pérdida de HBsAg, semana 96
Hombres no-Asiáticos**



b.

Figura 18

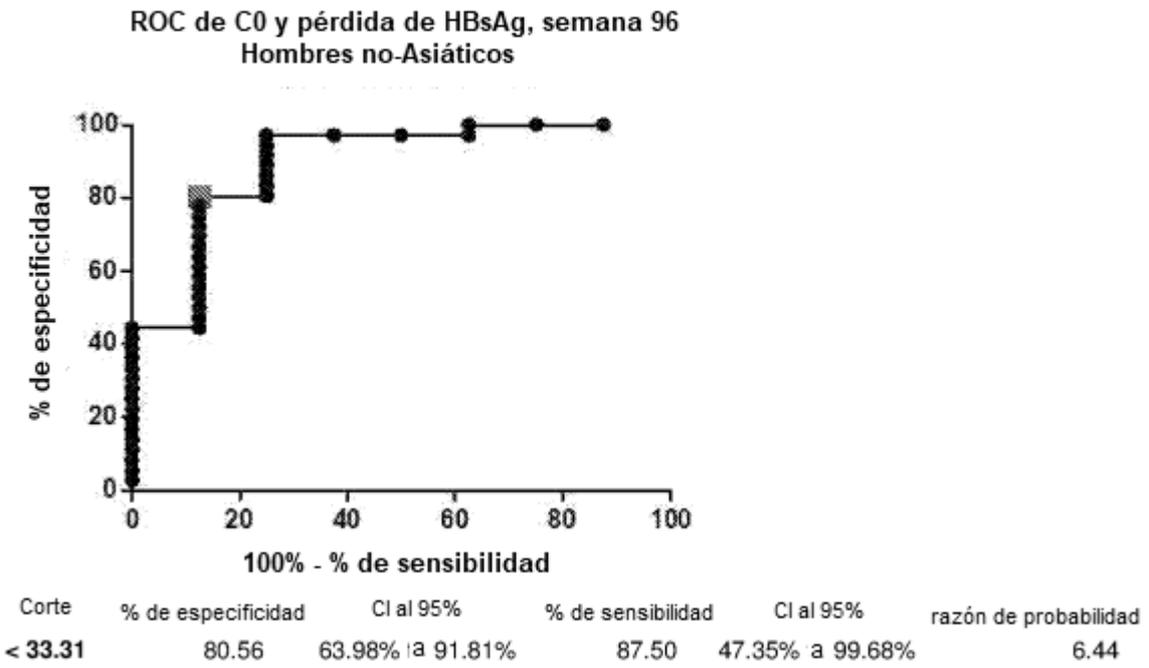


Figura 19

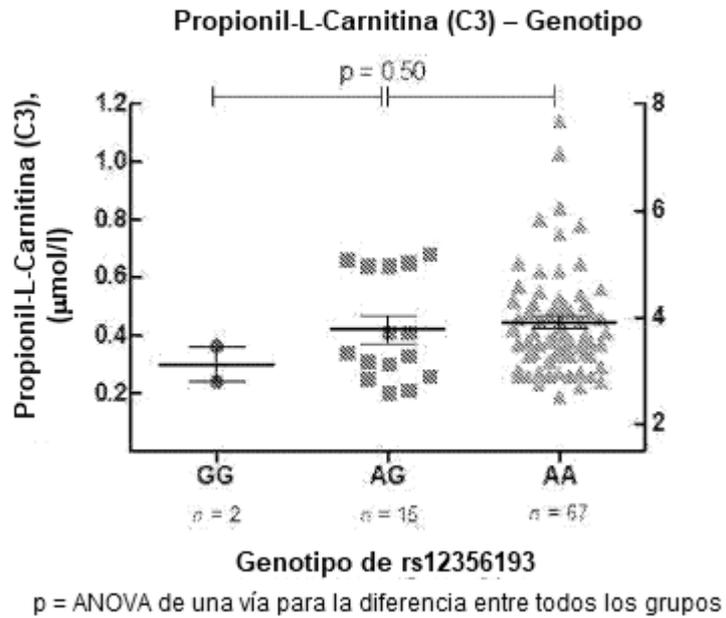
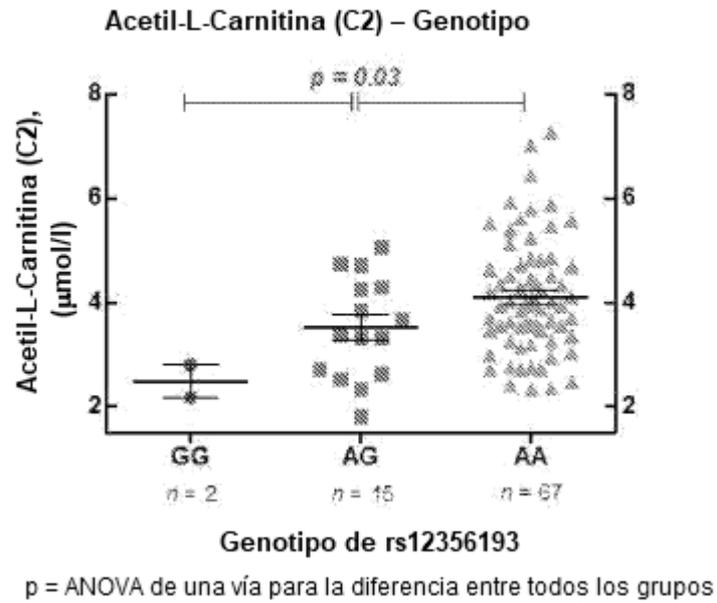
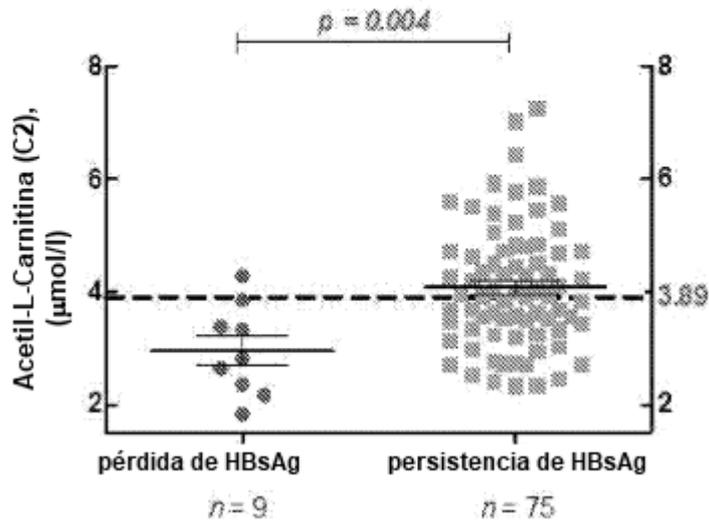


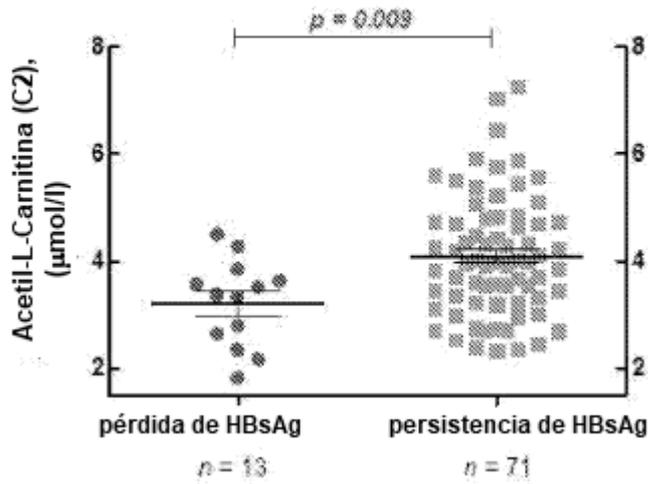
Figura 20

Acetil-L-Carnitina (C2) – pérdida de HBsAg, semana 96



p = prueba t de Student

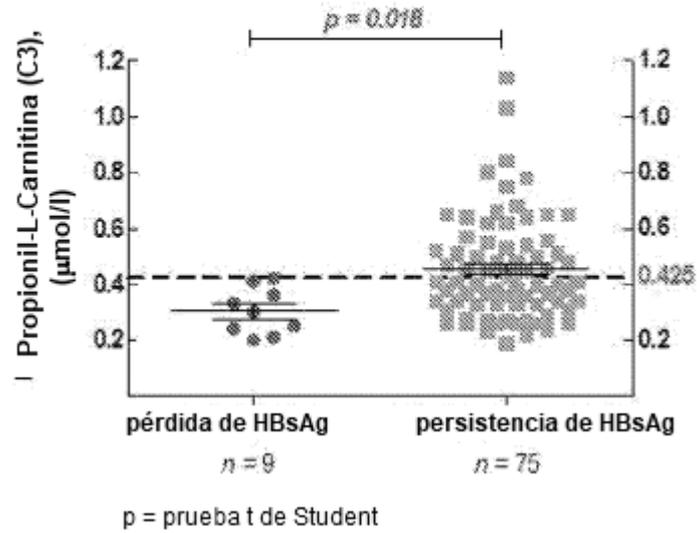
Acetil-L-Carnitina (C2) – pérdida de HBsAg, semana 144



p = prueba t de Student

Figura 21

Propionil-L-Carnitina (C3) – pérdida de HBsAg, semana 96



Propionil-L-Carnitina (C3) – pérdida de HBsAg, semana 144

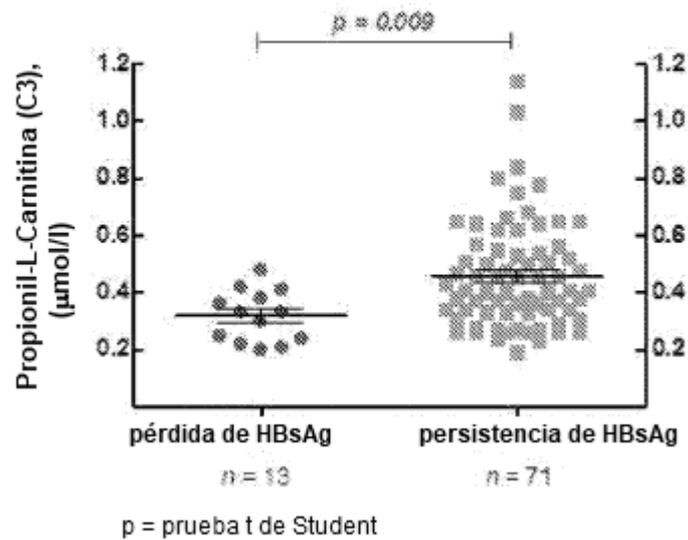
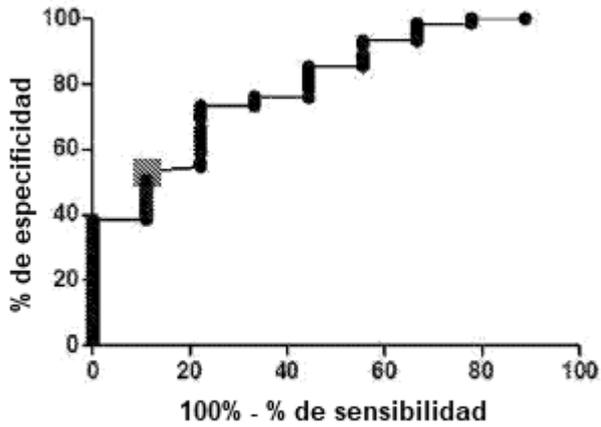


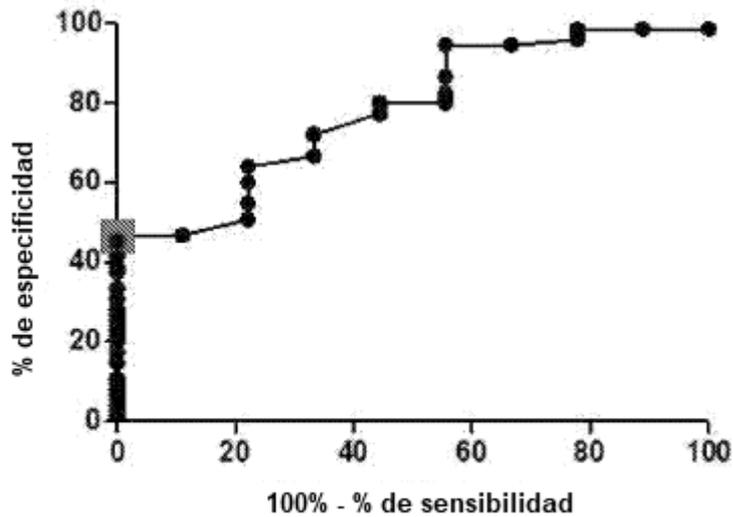
Figura 22

ROC de C2 y pérdida de HBsAg, semana 96



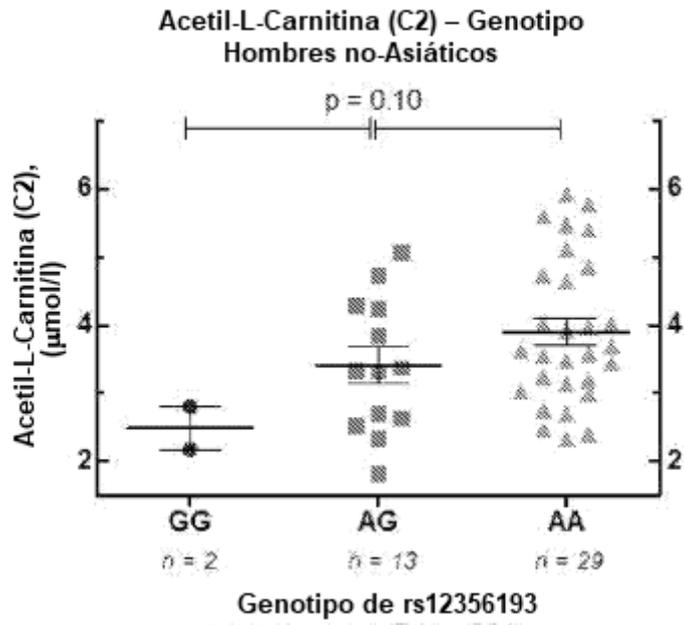
Corte	% de especificidad	CI al 95%	% de sensibilidad	CI al 95%	razón de probabilidad
> 3.885	53.33	41.45% a 64.95%	88.89	51.75% a 99.72%	4.80

ROC de C3 y pérdida de HBsAg, semana 96



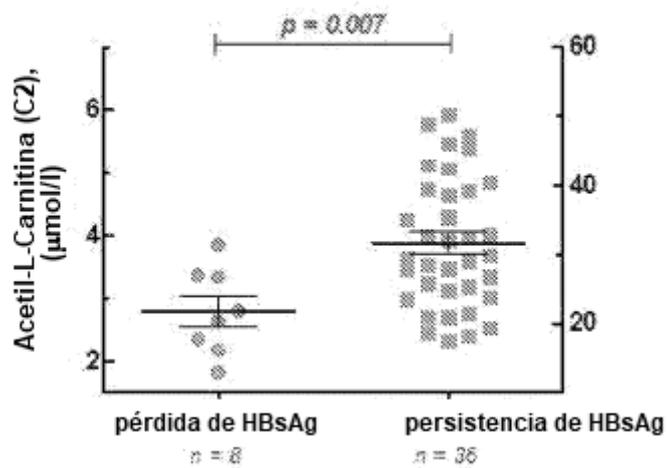
Corte	% de especificidad	CI al 95%	% de sensibilidad	CI al 95%
> 0.4250	46.67	35.05% a 58.55%	100.0	66.37% a 100.0%

Figura 23



a.

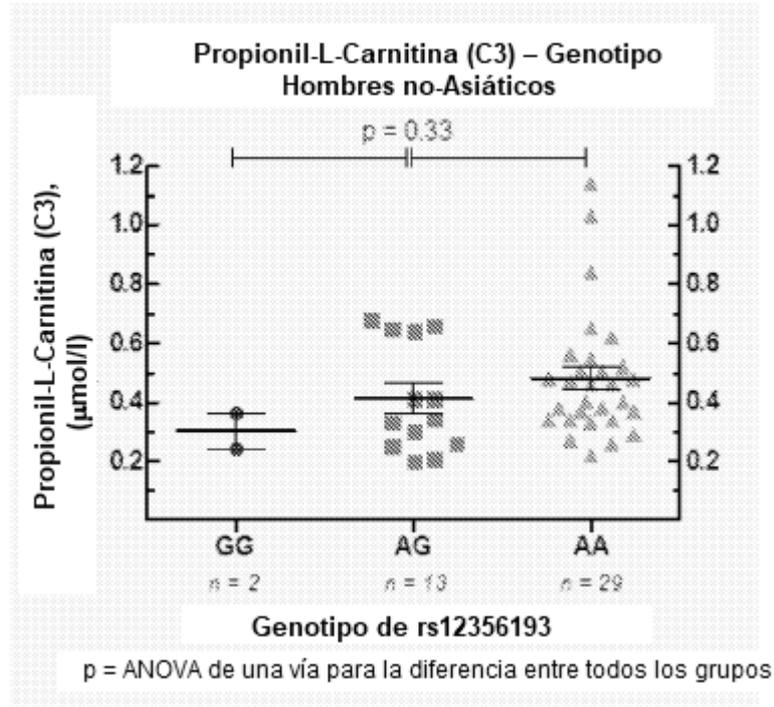
**Acetil-L-Carnitina (C2) – pérdida de HBsAg, semana 96
Hombres no-Asiáticos**



p = prueba t de Student

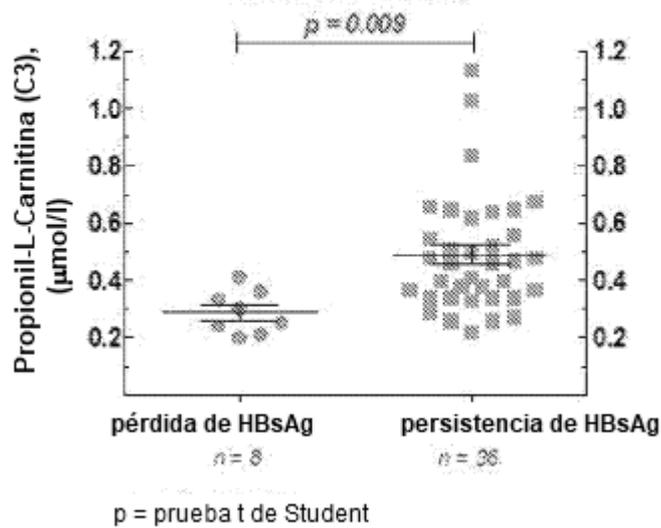
b.

Figura 24



a.

**Propionil-L-Carnitina (C3) – pérdida de HBsAg, semana 96
Hombres no-Asiáticos**



b.