

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de julio de 2014 (03.07.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/102439 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070938

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de diciembre de 2013 (30.12.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201232061
28 de diciembre de 2012 (28.12.2012) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** [ES/ES];
Avda. Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES).
SERVICIO ANDALUZA DE SALUD [ES/ES]; Avda. de
la Constitución, 18, E-41001 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **PEÑA MARTÍNEZ, José**; Facultad de
Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, E-14004 Córdoba
(ES). **GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, Rafael**; IMIBIC,
Edificio Consultas Externas Hospital Universitario Reina
Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n, E-14004 Córdoba (ES).
RIVERO ROMÁN, Antonio; Facultad de Medicina,
Avda. Menéndez Pidal s/n, E-14004 Córdoba (ES).
MANZANARES MARTÍN, Bárbara; IMIBIC, Edificio
Consultas Externas Hospital Universitario Reina Sofía,
Avda. Menéndez Pidal s/n, E-14004 Córdoba (ES).
RIVERO JUÁREZ, Antonio; IMIBIC, Edificio Consultas
Externas Hospital Universitario Reina Sofía, Avda.
Menéndez Pidal s/n, E-14004 Córdoba (ES). **CAMACHO
ESPEJO, Ángela**; IMIBIC, Edificio Consultas Externas

Hospital Universitario Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal
s/n, E-14004 Córdoba (ES). **DE LA TORRE CISNEROS,
Julián**; Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n,
E-14004 Córdoba (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible*): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,
KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,
SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible*):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING USEFUL DATA FOR PREDICTING THE RESPONSE TO THE TREATMENT OF HEPATITIS C

(54) Título : MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA PREDECIR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C

(57) Abstract: The invention relates to the use of the *KIR3DS1* gene for predicting or forecasting the response of an individual to the treatment of HCV with peg-IFN in addition to a guanosine analogue, preferably ribavirin (RBV). The invention also relates to a method, a kit and uses.

(57) Resumen: El uso del gen *KIR3DS1* para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanósina, preferentemente ribavirina (RBV), método, kit y usos.



WO 2014/102439 A1

Descripción

Título de la invención: Método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta al tratamiento de la Hepatitis C.

[1] **CAMPO DE LA INVENCION**

[2] La presente invención se encuentra dentro de la medicina y la biología molecular, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento de la hepatitis C, y en concreto, al empleo del gen *KIR3DS1* para predecir la respuesta al tratamiento de la hepatitis C con interferón pegilado mas análogos de ribavirina.

[3] **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[4] El tratamiento de la hepatitis crónica causada por VHC genotipo 1 ha experimentado un notable avance en los últimos meses. La disponibilidad de fármacos de acción directa (FAD) frente al VHC ha permitido construir nuevos regímenes de tratamiento que han superado ampliamente en eficacia a los regímenes anteriores basados en la asociación de interferon pegilado (PEG) mas ribavirina (RBV). Sin embargo el uso de FAD supone algunos inconvenientes que pueden llegar a limitar su uso, especialmente entre pacientes coinfectados por el VIH. En primer lugar las formulaciones disponibles en la actualidad incrementan el número de comprimidos que un paciente infectado por el VIH necesita tomar para tratar simultáneamente ambas infecciones, lo que puede dificultar la adherencia a ambos tratamiento. En segundo lugar los FAD disponibles en la actualidad tienen un alto potencial de interacciones con los fármacos antirretrovirales (FAR) que van a limitar las posibilidades de tratamiento simultáneo de ambas infecciones. En tercer lugar el uso simultaneo de FAD y FAR supone un incremento potencial de la incidencia de efectos adversos. Por último el alto coste de los FAD supone una importante limitación a su uso en momentos como el actual, de graves dificultades económicas. Por otro lado los ensayos clínicos de desarrollo de FAD han demostrado una eficacia de los regímenes basados en PEG/RBV en pacientes coinfectados por VIH y VHC superiores a los obtenidos en los ensayos clínicos iniciales de desarrollo de la combinación PEG/RBV. Esta mayor eficacia puede obedecer tanto al uso mas adecuado de los FAR, como a la mayor experiencia en el tratamiento del VHC que supone un mejor manejo de los efectos adversos provocados por el mismo.

[5] La posibilidad de identificar una población de pacientes coinfectados por VIH/VHC con alta probabilidad de respuesta al tratamiento del VHC genotipo 1 sin el uso de FAD supondría evitar el incremento del riesgo de efectos adversos e interacciones y permitiría un importante ahorro económico sin merma en la eficacia. Este hecho, demostrado al menos en el caso de pacientes que alcanzan RVR, justifica en la actualidad

la indicación de PEG/RBV como tratamiento electivo del VHC-genotipo 1 en un subgrupo de pacientes.

[6] *Tratamiento del VHC genotipo 1 con PEG/RBV*

[7] En pacientes monoinfectados por VHC diversos ensayos clínicos demostraron la superioridad de PEG-a 2a y 2b sobre Interferon-a 2a y 2b, y que era posible obtener mayores tasas de respuesta al utilizar PEG en combinación con RBV. Aunque algunos estudios sugirieron mayor eficacia de PEG-a 2a, ensayos clínicos randomizados en los que se enfrentaron *head to head* ambas formas de PEG no demostraron diferencias significativas en la eficacia entre ambas (McHutchison *et al.*, 2009. *P N Engl J Med.* 361:580-93). La dosis utilizada y seleccionada como óptima para el tratamiento del VHC genotipo 1 en los ensayos clínicos de desarrollo de PEG-a 2a fue de 180 mg/semana y en los de PEG-a 2b de 1,5 mg/kg/semana.

[8] En pacientes coinfectados, la combinación de PEG/RBV también ha obtenido mejores resultados que Interferon-a 2a y 2b, tanto con PEG-a 2a a dosis de 180 mg/semana, como con PEG-a 2b a dosis de 1,5 mg/kg/semana. Tampoco en pacientes coinfectados se ha demostrado diferencias significativas en la eficacia entre ambas formas de PEG.

[9] En pacientes monoinfectados por VHC, dosificar la RBV ajustándola al peso del paciente (1.000 ó 1.200 mg/día respectivamente para pacientes con <75 kg ó ≥75 kg) obtiene mayores tasas de RVS en comparación a dosis fijas de 800 mg/día. La dosis de RBV utilizada en los ensayos clínicos de pacientes coinfectados no ha sido uniforme. En algunos ha sido de 800 mg por temor a mayores tasas de efectos adversos que en monoinfectados y/o al desarrollo de interacciones medicamentosas. En otros en cambio se han utilizado dosis mayores alcanzando los 1.000 mg/d o ajustando la dosis al peso del paciente peso (<60 kg: 800 mg/d, 60-75 kg: 1.000 mg/d y >75 kg: 1.200 mg/d). En los ensayos clínicos en los que se ha usado RBV ajustada a peso, se han obtenido tasas de RVS más altas, por ello es la estrategia recomendada.

[10] Dosis más elevadas de RBV o PEG como estrategia de inducción durante las primeras semanas del tratamiento no han obtenido tasas de respuesta más altas.

[11] La duración del tratamiento en pacientes monoinfectados por VHC genotipo 1 habitualmente se programa para 48 semanas, aunque en pacientes que alcanzan RVR algunos estudios sugieren que se podría acortar la duración del tratamiento a 24 semanas sin comprometer la eficacia. En pacientes coinfectados por VIH/VHC se desconoce la duración óptima del tratamiento de la hepatitis crónica causada por VHC genotipo 1. Los ensayos clínicos se han diseñado habitualmente para una duración del tratamiento de 48 semanas. Diversos estudios han sugerido que la duración del tratamiento podría estar condicionada por la respuesta al mismo. De tal forma que se ha sugerido en respondedores lentos (pacientes que no alcanzan RVR o pacientes que no

- consiguen una RVP completa) debería extenderse el tratamiento hasta completar 72 semanas.
- [12] La ausencia de RVP (reducción 32 log10 respecto a la basal ó viremia negativa a las 12 semanas de tratamiento) tiene un alto valor predictivo negativo sobre RVS por lo que, en esta situación, se recomienda la interrupción del tratamiento.
- [13] *Tratamiento del VHC genotipo 1 con PEG/RBV mas Telaprevir o Boceprevir en monoinfectados.*
- [14] Los primeros fármacos disponibles con acción directa anti-VHC son Boceprevir (BOC) y Telaprevir (TEL) (Liu *et al.*, 2012. *Ann Intern Med.* 156:279-290.). Ambos fármacos son potentes inhibidores de la proteasa NS3 del VHC. Los ensayos clínicos de desarrollo de ambos fármacos se han llevado a cabo con distintas estrategia de tratamiento. En el caso de los ensayos clínicos de BOC se ha utilizado la llamada estrategia *lead-in*, en la cual los pacientes son tratados durante las 4 primeras semanas del tratamiento con PEG/RBV añadiéndose BOC a partir de la cuarta semana de tratamiento. En cambio en los ensayos clínicos de desarrollo de TEL se utilizó desde el inicio del tratamiento la combinación PEG/RBV/TEL.
- [15] La dosis de boceprevir es de 800 mg (4 cápsulas) cada 8 horas, administrados con comida. La dosis de telaprevir es de 750 mg (2 comprimidos) cada 8 horas, administrados con comida. En ambos fármacos los pacientes deben tragar los comprimidos enteros (sin masticar, triturar o disolver).
- [16] Boceprevir y telaprevir no están actualmente indicados en el tratamiento de la hepatitis crónica por el VHC causada por otros genotipos distintos al genotipo 1.
- [17] Evidencias en pacientes 'Naive':
- [18] En pacientes monoinfectados por VHC genotipo 1 se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos para evaluar la eficacia y seguridad de BOC (SPRINT-1 y SPRINT-2) y TEL (ILLUMINATE) en pacientes naive (Poordad *et al.*, 2011. *N Engl J Med* 364: 1195-206, Jacobson *et al.*, 2011. *N Engl J Med* 364: 2405-16).
- [19] En los ensayos clínicos de desarrollo de BOC las tasas de RVS fueron significativamente superiores en cada uno de los grupos tratados con la asociación PEG/RBV/BOC [63% en grupo de pacientes con terapia guiada por respuesta (TGR= tiempo de tratamiento establecido en 24 o 48 semanas según se obtuviera o no RVR extendida definida como carga viral del VHC indetectable desde la semana 8 a la 24) y 66% en el grupo de pacientes con tratamiento de 48 semanas] que en los pacientes que recibieron terapia estándar con PEG/RBV (38%). En relación al polimorfismo de *IL28B*, no se observaron diferencias en términos de RVS entre los grupos experimentales y el grupo control en los pacientes con genotipo CC. Sin embargo si se observaron diferencias significativas en pacientes con genotipos no-CC. Por último no se observaron diferencias entre los grupos experimentales y la terapia estándar en

aquellos pacientes que alcanzaron RVR (Poordad *et al.*, 2011. *N Engl J Med* 364: 1195-206).

- [20] En los ensayos clínicos de desarrollo de TEL las tasas de RVS fueron significativamente superiores en los grupos tratados con la asociación PEG/RBV/TEL que en los que recibieron PEG/RBV (75% en el grupo de pacientes que recibieron TEL durante 8 meses, 69% en el que recibieron TEL durante 12 meses vs. 44% en el grupo control). La tasa de RVS aumentó de forma significativa a favor de los grupos que recibieron TEL tanto en pacientes con polimorfismo CC como no-CC de *IL28*. Por último en pacientes que alcanzaron RVR, el tratamiento con PEG/RBV se alcanzaron tasas superiores de RVS que en los que recibieron TEL (94% y 84% respectivamente) (Jacobson *et al.*, 2011. *N Engl J Med* 364: 2405-16).
- [21] Evidencias en Pacientes con tratamiento previo
- [22] En pacientes monoinfectados por VHC genotipo 1 se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos para evaluar la eficacia y seguridad de BOC (RESPOND-2) y TEL (ADVANCE y REALIZE) en pacientes pretratados (Bacon *et al.*, 2011. *N Engl J Med* 364:1207-17; Zeuzem *et al.*, 2011. *N Engl J Med* 364:2417-28).
- [23] En el estudio RESPOND-2, las tasas de RVS fueron significativamente superiores en los pacientes (tanto recidivas como respondedores parciales) tratados con boceprevir. Las tasas de RVS en pacientes con recidiva fueron 59% (terapia guiada por respuesta), 66% (tratamiento 48 semanas) vs. 21% (PEG/RBV). Las tasas de RVS en respondedores parciales fueron 40% (terapia guiada por respuesta), 52% (tratamiento 48 semanas) vs. 7% (PEG/RBV). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de RVS entre el grupo experimental (tratamiento 48 semanas) y el grupo PEG/RBV en pacientes con fibrosis F0/F1 (70% vs 25%), F2 (64% vs 15%) y F3/F4 (68% vs. 13%). En este ensayo clínico no se incluyeron pacientes con respuesta nula (null responders) al tratamiento previo.
- [24] En el estudio REALIZE las tasas de RVS fueron significativamente superiores en los pacientes tratados con TEL (administrado durante 12 semanas), tanto en recidivas (83% vs 24%), como en respuestas parciales (59% vs. 15%) y en no respondedores (29% vs. 5%). Estas diferencias se observaron con independencia del polimorfismo genético *IL28B* y del grado de fibrosis (fibrosis mínima: 85% vs. 35%, fibrosis portal: 81% vs. 28% y fibrosis en puentes/cirrosis: 84% vs. 13%).
- [25] Reglas de Parada
- [26] En el caso de tratamiento con PEG/RBV + TEL se deberá parar todo el tratamiento del VHC si la determinación de ARN-VHC en semana 4 ó 12 es > 1000 UI/mL.
- [27] En el caso de tratamiento con PEG/RBV + BOC se deberá parar todo el tratamiento del VHC si la determinación de ARN-VHC en semana 12 es > 100 UI/mL ó si permanece detectable en semana 24.

- [28] Si por cualquier razón se tuviera que suspender el tratamiento con PEG/RBV, también se deberá suspender el tratamiento con BOC ó TEL.
- [29] *Tratamiento de la hepatitis Crónica por VHC con TEL ó BOC en pacientes coinfectados por VIH/VHC genotipo 1*
- [30] Evidencias. Boceprevir y telaprevir han sido autorizados por la Comisión Europea mediante un procedimiento centralizado para su uso en pacientes monoinfectados por VHC genotipo 1. En la actualidad no esta aprobada su indicación pacientes infectados por el VIH. En España el acceso a los medicamentos en condiciones diferentes a las autorizadas está regulado por el Real Decreto 1015/2009, de 19 de junio. Esta regulación, establece que la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) «podrá elaborar recomendaciones de uso de medicamentos en condiciones no contempladas en la ficha técnica cuando el uso del medicamento en estas condiciones suponga un impacto asistencial relevante». De este modo la AEMPS ha elaborado unas recomendaciones que regula y permite el uso de Boceprevir y Telaprevir en pacientes coinfectados por VIH/VHC. La experiencia en ensayos clínicos con ambos fármacos es limitada.
- [31] En un ensayos clínico, randomizado (2:1) doble ciego, controlado con placebo se comparó la eficacia y seguridad de BOC mas PEG/RBV versus PEG/RBV en pacientes coinfectados por VIH/VHC genotipo 1. Se incluyeron en el estudio 98 pacientes naive de los que 34 recibieron PEG/RBV y 64 BOC/PEG/RBV. Los pacientes que recibieron BOC presentaron una tasas de RVS (medida en semana + 12 de tratamiento) superiores a los que recibieron PEG/RBV (60,7% vs 26.5%, $p<0.01$). Conviene destacar que en el estudio de los pacientes que recibieron TAR basado en IP/r (Atazanavir, Darunavir ó Lopinavir), el 67% alcanzaron RVS. El porcentaje de pacientes que abandonaron el estudio por efectos adversos fue superior en la rama de BOC (20% vs. 9%).
- [32] En un ensayos clínico, randomizado, doble ciego, controlado con placebo se comparó la eficacia y seguridad de TEL mas PEG/RBV versus PEG/RBV en pacientes coinfectados por VIH/VHC genotipo 1. Se incluyeron en el estudio 60 pacientes naive de los que 22 recibieron PEG/RBV y 38 TEL/PEG/RBV. Los pacientes que recibieron TEL presentaron una tasas de RVS (medida en semana + 12 de tratamiento) superiores a los que recibieron PEG/RBV (74% vs 45%). El porcentaje de pacientes que abandonaron el estudio por efectos adversos fue superior en la rama de TEL (8% vs. 0%).
- [33] *Indicación de tratamiento en pacientes coinfectados por VIH/VHC*
- [34] Para la utilización de BOC o TEL en pacientes coinfectados por el VIH se requieren los siguientes criterios (10):
- [35] Criterios dependientes del VHC
- [36] A.- Infección por VHC genotipo 1, independientemente de que el paciente haya

recibido o no tratamiento previo para el VHC

- [37] B.- Fibrosis F3 y F4 confirmada por biopsia hepática o rigidez hepática medida por Fibroscan >9.5 Kilopascals. Independientemente del grado de fibrosis, se podrá considerar iniciar tratamiento con BOC o TEL en pacientes con manifestaciones extrahepáticas graves de la infección por VHC como por ejemplo aquellas derivadas de la crioglobulinemia mixta policlonal.

- [38] C.- Hepatopatía crónica compensada (Child-Pugh grado A)

- [39] D.- Concentración de hemoglobina >11 g/dl en mujeres y >12 g/dl en hombres

- [40] Criterios dependientes del VIH

- [41] E.- Linfocitos CD4+ totales en sangre periférica >100 /ml o porcentaje de linfocitos CD4+ >12%

- [42] F.- Carga viral plasmática de VIH <1000 copias/ml (pacientes en TAR)

- [43] Estrategia de tratamiento según la realización o no de tratamiento previo y de la respuesta a este.

- [44] a) Enfermos naïve:

- [45] Se recomienda considerar el inicio del tratamiento par el VHC genotipo 1 en todo paciente con un grado de fibrosis F3-F4. Con independencia del genotipo de la *IL28* y de otras características basales del paciente se recomienda iniciar el tratamiento con PEG/RBV a dosis estándar durante 4 semanas actuando posteriormente en función de la respuesta obtenida. Aquellos pacientes que alcancen RVR (ARN-VHC indetectable en semana 4) podrían continuar el tratamiento con PEG/RBV sin necesidad de añadir TEL o BOC. Aquellos pacientes que no alcancen al menos una disminución del ARN-VHC de 1 log en la semana 4 del tratamiento con PEG/RBV presentan una baja probabilidad de alcanzar RVS. Por ello en estos casos se actuará en función del grado de fibrosis de los pacientes. En aquellos pacientes con alto riesgo de progresión de la hepatopatía (Fibroscan > 40 kPa) se continuará tratamiento añadiendo TEL o BOC ya que esta terapia es la única opción de evitar, aunque sea con muy baja probabilidad de éxito, la descompensación de la hepatopatía. En aquellos pacientes con menor probabilidad de progresión de la hepatopatía (F3 ó rigidez hepática inferior a 40 kPa) se suspenderá el tratamiento en espera de futuras opciones terapéuticas. En aquellos pacientes con descenso del ARN-VHC mayor de 1 log en semana 4 pero que no alcanzan RVR, se continuará el tratamiento añadiendo TEL o BOC.

- [46] El grupo HEPAVIR recomienda considerar el uso de PEG/RBV sin FAD en pacientes con genotipo CC de *IL28* y carga viral del VHC baja (inferior a 600.000 copias/mL).

- [47] b) Recidivas tras un tratamiento con PEG/RBV.

- [48] En estos casos también se requerirá un grado de fibrosis F3 ó F4, ó rigidez hepática > 9.5 kPa para considerar iniciar el tratamiento. En caso de recidiva se recomienda

iniciar el tratamiento siguiendo las recomendaciones de ficha técnica de cada uno de los medicamentos sin que sea necesario valorar la respuesta a la cuarta semana del tratamiento.

[49] c) Respondedores parciales a un tratamiento con PEG/RBV

[50] Se recomienda iniciar el tratamiento con PEG/RBV a dosis estándar durante 4 semanas actuando posteriormente en función de la respuesta obtenida. Para la toma de decisiones se utilizarán los mismos criterios expresados para el paciente naive.

[51] d) Respondedores nulos a un tratamiento con PEG/RBV

[52] Se consideran respondedores nulos a aquellos que no han alcanzado un descenso del ARN-VHC superior a 2 log a las 12 semanas de un tratamiento previo con PEG/RBV. La probabilidad de alcanzar RVS con un nuevo tratamiento con un régimen que incluya BOC ó TEL es muy baja. Por esta razón en esos pacientes se actuará según el riesgo de progresión de su hepatopatía. En caso de pacientes cirróticos con muy alta probabilidad de descompensación a corto plazo (rigidez hepática > 40 kPa) se recomienda iniciar tratamiento ya que el tratamiento con BOC ó TEL es la única opción de evitar, aunque sea con muy baja probabilidad de éxito, la descompensación de la hepatopatía. En el resto de paciente se considerará diferir el inicio del tratamiento con estrecha monitorización de los pacientes en espera de nuevas opciones de tratamiento.

[53] e) Pacientes con terapia subóptima o respuesta al tratamiento previo desconocida.

[54] En pacientes con tratamiento previo subóptimo (monoterapia con PEG, terapia combinada con Interferon no pegilado mas RBV), abandono del tratamiento sin causa médica, retirada del tratamiento por toxicidad que pudiera ser manejada con éxito en la actualidad (anemia sin uso de Eritropoyetina, reducción de dosis de ribavirina o trasfusiones, neutropenia sin uso de factores estimulantes de colonias de granulocitos, toxicidad por el uso concomitante de DDI, D4T ó AZT, depresión sin tratamiento ni profilaxis...), o respuesta al tratamiento previo desconocida, se recomienda actuar como en el caso de pacientes naive.

[55] Tratamiento antirretroviral compatible con BOC ó TEL

[56] BOC y TEL presenta interacciones con fármacos antiretrovirales que limitan su uso conjunto. En la actualidad se encuentra permitido el uso de BOC con los siguientes fármacos antiretrovirales: Análogos de nucleósidos (Abacavir; Emtricitabina, Lamivudina y Tenofovir) e inhibidores de la integrasa (raltegravir). No está permitido el uso de BOC con no Análogos de los nucleósidos, Inhibidores de la proteasa (existen discrepancia entre los estudios de interacciones farmacocinéticas realizados en voluntarios sanos y los resultados de ensayos clínicos que han demostrado altas tasas de RVS con ATV/r, DRV/r y LPV/r), Inhibidores del correceptor CCR5 e inhibidores de la entrada.

[57] En la actualidad se encuentra permitido el uso de TEL con los siguientes fármacos

antiretrovirales: Análogos de nucleósidos (Abacavir; Emtricitabina, Lamivudina y Tenofovir), inhibidores de la integrasa (raltegravir), No Análogos de los nucleósidos (Efavirenz, incrementando la dosis de telaprevir a 1.125 mg/8, Etravirina y Rilpivirina) e inhibidores de la proteasa (Atazanavir/ritonavir). No está permitido el uso de TEL con Inhibidores del correceptor CCR5 e inhibidores de la entrada (10).

[58] *Predicción de la Respuesta al tratamiento*

[59] La respuesta al tratamiento frente al VHC se asocia con una menor progresión de la fibrosis hepática y, por lo tanto, con una menor probabilidad de la muerte por hepatopatía en el paciente coinfectado por el VIH y el VHC. En la última década, el tratamiento estándar frente al VHC ha sido la biterapia con interferón pegilado (IFN-Peg) más ribavirina (RBV). Sin embargo, las tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) que se alcanzan con este régimen son subóptimas (Neukam *et al.*, 2009. Exp Opin Pharmacother 10: 417-433), obteniéndose unas tasas de RVS del 27-50%. Además, el tratamiento no está exento de efectos adversos, que pueden llegar incluso a ser graves. En pacientes coinfectados por el VIH, además, existen interacciones con el tratamiento antirretroviral (TAR), que supone una limitación de gran relevancia clínica. Por todo ello, la estimación de la probabilidad de la respuesta al tratamiento frente al VHC tiene una importante implicación clínica de modo que la identificación de pacientes con una probabilidad muy baja de alcanzar RVS podría ayudar a mejorar el manejo de este tratamiento. Así, se podría posponer el tratamiento en pacientes sin fibrosis hepática avanzada potenciales no respondedores al tratamiento, hasta que se aprueben los nuevos antivirales de acción directa para el paciente coinfectado por VIH/VHC, a fin de conseguir mayor eficacia. Por el contrario, individuos con una probabilidad muy alta de alcanzar RVS con IFN-Peg más RBV, podrían no beneficiarse del uso de los nuevos antivirales y por este motivo podrían ser tratados con biterapia.

[60] Entre los factores predictores pre-tratamiento de RVS descritos en pacientes coinfectados por el VIH y el VHC, aquellos con mayor valor predictivos son el genotipo del VHC, la carga viral basal del VHC y las variaciones genéticas del huésped. Así, mientras que la tasa de respuesta al tratamiento con IFN-Peg más RBV observada en pacientes infectados por el genotipo 2 ó 3 oscila entre un 44-72%, en los pacientes infectados por el genotipo 1 ó 4, las tasas de RVS se encuentran entre el 17-35%. Del mismo modo, una carga viral plasmática basal menor de 600-800 kUI/ml se asocia con una mayor tasa de RVS en esta población.

[61] Por otro lado, recientemente se han descrito varios marcadores genéticos del huésped con alto valor predictivo para respuesta al tratamiento. En este sentido, el polimorfismo (*single nucleotide polymorphism*, SNP) rs12979860 del nucleótido único situado en el cromosoma 19, en las proximidades del gen de la interleuquina 28B (*IL28B*), está asociado estrechamente con el aclaramiento del VHC inducido por el tratamiento con

IFN-Peg más RBV (12-14). Así, un 71% de los portadores del genotipo CC (definido como genotipo favorable) de *IL28B* alcanzan RVS frente un 34% observado en portadores del genotipo no-CC. No obstante, las tasas de respuesta observadas en la población infectada por el genotipo 1 ó 4, portadores del genotipo de la *IL28B* favorable, son de un 50% entre los pacientes, por lo cual, una importante proporción de pacientes queda mal clasificada. Del mismo modo, se ha identificado el SNP rs14158 en el gen del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) como un importante predictor de la respuesta al tratamiento con IFN-Peg más RBV en pacientes coinfectados por VIH/VHC (Pineda *et al.*, 2011. *AIDS* 25:1415-1420). No obstante, la gran importancia de este marcador radica en su efecto sinérgico con el genotipo de *IL28B* en pacientes infectados por el genotipo 1 ó 4 del VHC. En este sentido, pacientes coinfectados portadores de ambos genotipos favorables de la *IL28B* y de rs14158 (CC/CC) presentan una tasa de RVS del 70%, mientras que solamente un 14% de los pacientes portadores de los ambos genotipos desfavorables (no-CC/no-CC) alcanzan RVS (15-17).

[62] Por último, la cinética viral en respuesta al tratamiento del VHC es de gran utilidad tanto para predecir la probabilidad de respuesta al tratamiento como para individualizar la duración, régimen de tratamiento, y su necesidad de discontinuación. En este sentido, la respuesta en semana 4 tras inicio del tratamiento es el factor mejor factor predictivo tanto al tratamiento estándar como a la triple terapia (Jacobson *et al.*, 2011. *N Engl J Med* 364: 2405-16). Por otro lado, se ha observado que la cinética viral en los primeros días del tratamiento del VHC es una herramienta muy útil en la evaluación de factores predictivos de respuesta y en la comparación de la eficacia de distintos regímenes de tratamiento (Rivero-Juárez *et al.*, 2012. *J Antimicrob Chemother.* Jan;67(1):202-5.).

[63] Las células NK juegan un papel importante en la respuesta inmune innata y a la vez son los linfocitos más predominantes en el hígado [Borrego *et al.*, 2002. *Mol Immunol.* 38: 637-60]. Se ha informado que una disminución de células NK intrahepática y en sangre periférica la infección por el VHC [Neukam *et al.*, 2009. *Exp Opin Pharmacother* 10: 417-433] conduce a deficiencias en la activación de las células NK que podría favorecer la cronificación de la enfermedad. El tratamiento del VHC, sin embargo, parece conducir a una activación masiva de la respuesta inmune innata [Rivero-Juárez *et al.*, 2012. *J Antimicrob Chemother.* Jan;67(1):202-5] y de las células NK debido al hecho de que el IFN- α es un potente activador de estas células [Pineda *et al.*, 2010. *Clin Infect Dis.* Oct 1; 51(7):788-95]. Los receptores de células Natural Killer (receptores KIR) son receptores que se encuentran en su superficie asociados ya sea con la activación de estas células (S-KIR o con su inhibición L-KIR [Pineda *et al.*, *AIDS* 2011, 25:1415-1420]. La presencia de varios receptores KIR (2DL2, 2DL3,

2DS1 2DS2 y 3DL1) se ha asociado con el grado de eficiencia del tratamiento del virus HCV [Neukam *et al.*, 2011. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Dec 1;58(4):e115-7]. Así, la expresión de S-KIR en la superficie de la célula NK promueve la citólisis y la producción de IFN-gamma contra células diana que expresan específicamente ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I [Borrego *et al.*, 2002. *Mol Immunol*. 38: 637-60]. Esto indica que la acción KIR está condicionada por la presencia de un ligando específico en la célula diana, por ello y, con el fin de evaluar la posible influencia de los KIR en la respuesta al tratamiento, es necesario determinar la presencia de su ligando específico.

[64] El receptor KIR3DS1, que sabemos tiene acción activante de las células NK, se ha descrito como poseedor de un papel protector contra el desarrollo del carcinoma hepatocelular en pacientes infectados por el VHC [Borrego *et al.*, 2002. *Mol Immunol*. 38: 637-60]. Sin embargo, su impacto sobre el resultado del tratamiento del VHC no se ha descrito.

[65] Es importante, por tanto, encontrar nuevos biomarcadores que puedan emplearse para predecir la respuesta al tratamiento del VHC.

[66] .

[67] DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[68] La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento del HCV, y específicamente, al tratamiento con Peg-IFN/RBV. Los autores de la presente invención han encontrado un biomarcador útil para predecir la respuesta al tratamiento de la hepatitis C, que es una característica clave de la práctica clínica para determinar el tratamiento en pacientes VHC del genotipo 1 co-infectados con VIH, y que podrían conducir a los médicos a detectar aquellos pacientes con una probabilidad mayor a responder a la terapia Peg-IFN/RBV.

[69] Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del gen *KIR3DS1* para predecir la respuesta de un individuo al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina. En una realización preferida, el análogo de la guanosina es la ribavirina (RBV).

[70] En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el individuo está coinfectado por el VIH y el VHC. En otra realización preferida, el VHC es del genotipo 1.

[71] La terapia antiviral va dirigida básicamente a lograr unos objetivos virológicos, bioquímicos e histológicos. La evaluación de la respuesta al tratamiento, se basa en el efecto del mismo sobre el estado virológico, no sólo al terminar el tratamiento sino, lo que es más importante, en su seguimiento después de finalizado el mismo. Tal y como se entiende en esta memoria, se denomina 'respuesta virológica sostenida' o 'respuesta

viral sostenida' (RVS) la negativización de la viremia (ARN viral negativo mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa -PCR-) que se mantiene al menos 24 semanas después de finalizado el tratamiento; o dicho de otra manera, la ausencia en el suero del ARN-VHC a los 6 meses de finalizado el tratamiento.

- [72] La negativización de la viremia al final del tratamiento, con reaparición del ARN una vez terminado el mismo, define la 'respuesta virológica con recaída'. La ausencia de negativización de la viremia al final del tratamiento define la 'no respuesta virológica' al tratamiento.
- [73] El 'interferón alfa' (IFN- α) es una citocina inmunomoduladora que posee actividad antiviral, propiedades antiangiogénicas y antiproliferativas. El IFN-Peg se obtiene mediante la unión fisicoquímica de polietilenglicol (PEG) al interferón alfa (peginterferón α -2a y α -2b) recombinante, lo que aumentan su permanencia en la sangre requiriendo menor frecuencia de inyecciones.
- [74] Actualmente existen dos tipos de interferones pegilados comerciales cuya aplicación se ha extendido: peginterferón alfa-2a (Pegasys®, Roche) y peginterferón alfa-2b (Pegintron®, Schering-Plough). Estos dos productos son semejantes con respecto a su eficacia y seguridad pero sus regímenes de dosificación difieren levemente.
- [75] La ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-1H-1 ,2,4-triazol-3-carboxamida) es un nucleótido sintético análogo de la guanidina, con propiedades antivirales y actividad inmunorreguladora. Fue una de las primeras drogas que demostró su eficacia para reducir la capacidad de reproducción de virus. Está descrita en el Índice Merck, compuesto N ° 8199, undécima edición. Su fabricación y formulación se describen en la patente de EE.UU. n. No. 4.211.771.
- [76] La rápida captación eritrocitaria de la ribavirina y su fosforilación son responsables de la importante anemia hemolítica dependiente de la dosis. Con el fin de evitar este efecto indeseado, el diseño de los nuevos fármacos contempla que no sean captados o fosforilados por los eritrocitos o que sean captados rápidamente y fosforilados en el hígado. Ambos enfoques tienen la desventaja potencial de que pueden anular pasos fundamentales que contribuyen con la eficacia terapéutica de la ribavirina.
- [77] Otros derivados, profármacos o análogos de la ribavirina son la viramidina y la levovirina.
- [78] La viramidina es un profármaco de la RBV, en el hígado se convierte en RBV por acción de la adenosindeaminasa hepática. La RBV y viramidina son rápidamente eliminadas, sus moléculas y los metabolitos son excretados por el riñón y tienen una T_{máx} de 1,5-3 h. Experimentalmente, la retención hepática de la RBV derivada de una dosis oral de viramidina es 3 veces mayor que la RBV oral. En cambio, la concentración de fosfatos de RBV en los hematíes es mucho menor, de ahí que se pueda mantener una concentración más estable de hemoglobina. Es un fármaco seguro y se

- tolera bien. Los efectos adversos con dosis de 200, 600 y 1.200 mg fueron: 0, 26 y 50%, respectivamente; la mayoría leves y desaparecieron sin secuelas.
- [79] La levovirina es la L-enantiomero de la RBV y no origina anemia hemolítica. Tiene una actividad inmunomoduladora similar a la RBV, pero no tiene actividad antiviral directa.
- [80] Otros posibles análogos se describen, por ejemplo, pero sin limitarnos, en la patente WO 2010/135520.
- [81] La ribavirina por sí sola no es eficaz contra el VHC, pero cuando se la combina con interferón, los índices de erradicación viral son mucho mejores comparados con aquellos logrados solamente con interferón.
- [82] El 'genotipo del VHC', o 'cepa viral' se determina por una prueba de sangre. El virus de la hepatitis C se ha clasificado en seis genotipos distintos en base a diferencias en sus genomas, estos genotipos a su vez se subdividen. La preponderancia y distribución de dichos genotipos varía de modo global. Por ejemplo, en Norte América predomina el genotipo 1, seguido de 2 y 3. En Europa predomina el genotipo 1 seguido de 3, 4 y 2. Los genotipos 4 predomina en Egipto, 5 se da casi exclusivamente en África y genotipo 6 en el sudeste asiático.
- [83] El genotipo tiene importancia clínica ya que determina la respuesta potencial de la terapia actual y la duración que va a requerir la misma. Los genotipos 1 y 4 responden menos a dicho tratamiento que los otros (genotipos 2, 3, 5 y 6). La duración de la terapia estándar basada en el interferón para los genotipos 1 y 4 es de 48-72 semanas, mientras que para los genotipos 2 y 3 es solo de 12-24 semanas. En resumen, algunos genotipos del VHC, tales como los tipos 2 y 3, son más fáciles de erradicar que el tipo 1.
- [84] Se denomina 'carga viral plasmática basal de ARN del VHC', a la cantidad de ARN del VHC en la sangre (suero). Su presencia es indicativa de una infección activa con reproducción viral en curso. La carga viral suele expresarse en unidades logarítmicas [$\log_{10}$ IU/ml].
- [85] Para el pronóstico se considera que a mayor carga viral basal, menor probabilidad de una respuesta sostenida. La respuesta al tratamiento antiviral se evalúa con una carga viral basal (pre-tratamiento) y al menos una carga viral al término de éste y a las 24 semanas post tratamiento. Se considera una respuesta al tratamiento antiviral si se obtiene una carga viral indetectable al término del tratamiento y una carga viral indetectable y/o ARN cualitativo negativo a las 24 semanas (respuesta viral sostenida). Igualmente se ha determinado que una caída de la carga viral temprana (respuesta viral precoz), con descenso de 2 $\log_{10}$ UI/ml o más a las 12 semanas intra-tratamiento, permite evaluar anticipadamente la probabilidad de obtener una respuesta virológica sostenida al término de la terapia.

- [86] Otro aspecto de la invención se refiere al uso simultáneo de los genes *KIR3DS1* e *IL28B* para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina.
- [87] El genotipaje del gen '*IL28B*' se puede obtener, preferiblemente, pero sin limitarnos, secuenciando el gen completo pero aún más preferiblemente, se obtiene analizando el polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) rs12979860 (SEQ ID NO: 5) situado en el cromosoma 19, en las proximidades del gen de la interleucina 28B (*IL28B*).
- [88] La secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 6 es:
- [89] CTGAACCAGGGAGCTCCCCGAAGGCG[C/T]GAACCAGGGTTGAATTGCAC
TCCGC
- [90] MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES, MÉTODO DE PRONÓSTICO Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA AL TRATAMIENTO DEL VHC CON QUIMIOTERAPIA
- [91] Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la RVS al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:
- [92] a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- [93] b) determinar el genotipo del gen *KIR3DS1* y de su ligando *Bw4* en la muestra aislada de (a).
- [94] La presencia en un paciente del gen *KIR3DS1* favorece la respuesta al tratamiento con Interferón pegilados (IFN-PEG) y Ribavirina (o análogos). Además, los autores de la presente invención han determinado que:
- [95] 1. 1. La presencia conjunta del gen *KIR3DS1* y su ligando *HLA-Bw4* supone un factor de mejor respuesta que cuando se presenta sólo el *KIR3DS1*.
- [96] 1. 2. La presencia conjunta del gen *KIR3DS1* sin el ligando *HLA-Bw4* y de la variante polimórfica de *IL28B* CC responden mejor que aquellos enfermos que poseen sólo bien el gen *KIR3DS1* o bien la variante *IL28B* CC.
- [97] 1. 3. En todo caso la mejor combinación predictiva de buena respuesta se presenta en aquellos enfermos que presentan simultáneamente los genes *KIR3DS1*, *HLA-Bw4* y además *IL28B* CC.
- [98] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para predecir o pronosticar la RVS al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) del primer método de la invención, y además comprende:
- [99] c) clasificar a los individuos que presentan el genotipo *KIR3DS1*, en el grupo de pacientes buenos respondedores al tratamiento o con un mejor pronóstico.
- [100] En una realización preferida, el método permite clasificar a los individuos que

presentan el genotipo *KIR3DS1* y su ligando funcional *Bw4*, en el grupo de pacientes buenos respondedores al tratamiento o con un mejor pronóstico.

[101] En otra realización preferida, el análogo de la guanosina es la ribavirina (RBV).

[102] En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el individuo está coinfectado por el VIH y el VHC. En otra realización preferida, el VHC es del genotipo 1.

[103] Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

[104] El término 'muestra biológica aislada' incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, como sangre, suero, orina, saliva, fluido cerebrospinal, o a una muestra sólida o semisólida, como tejidos, heces, y similar, o alternativamente, un tejido sólido tales como aquellos usados habitualmente en diagnóstico histológico, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

[105] Existen más de 100 métodos distintos de genotipado de SNPs, siendo cualquiera aplicable en la presente invención. Por ejemplo, sin limitarnos, puede detectarse empleando desde enzimas de restricción o por secuenciación simple mediante PCR, sondas ASO e hibridación en Micromatrices de ADN o esferas. Así, por ejemplo, como métodos de amplificación de SNPs se encuentran la PCR, el método Invader, la amplificación por ADN de círculo rodante, etc. Como métodos de discriminación alélica, pueden emplearse, pero sin limitarnos, hibridación específica de alelo, ligamiento de oligonucleótidos específicos de alelo, minisequenciación o extensión de sondas (SBE, Single Base Extension), rotura invasiva específica de alelo (Invader), etc. Según el formato de detección, podemos citar, también sin limitarnos, el uso de sondas Taqman, de molecular beacons, scorpion, etc. Respecto a reacciones en un soporte sólido, tenemos, por ejemplo, biochips y microarrays de ADN, u otros métodos que emplean partículas, como por ejemplo, Luminex 100, BeadArray, etc. También existen métodos de detección masiva, como la pirosecuenciación, o la miniaturización.

[106] En otra realización preferida, el genotipado de *KIR3DS1* se realiza mediante PCR, y más preferiblemente, con los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5, o con los cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

[107] En una realización preferida de la presente invención, el genotipado de *KIR3DS1* se ha realizado siguiendo el método descrito en Vilches *et al.*, 2007. *Tissue Antigens*. Nov; 70(5):415-22.

[108] En una realización particular, en cada reacción 100 ng de ADN genómico son amplificados en 10 ml de buffer de PCR (67 mM Tris-HCL pH 8.8, 16 mM (NH₄)₂ SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20, 100 μM dNTP conteniendo 0.3 u de Taq polimerasa

(ECO Taq, Ecogen SRL, Barcelona, España).

[109] Las condiciones de PCR fueron:

[110] 2 min a 95° de desnaturalización seguidos de 10 ciclos de 10 s a 94°C, 40 s a 65°C y 20 ciclos de 20 s a 94°C, 20 s a 61°C y 30s a 72°C. 5 m l del producto de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 3% con distancia de migración de 3 cm.

[111] En otra realización preferida, el paso (b) de cualquiera de los métodos de la invención, además comprende determinar el genotipo del gen *IL28B*. Más preferiblemente, la determinación del genotipo de *IL28B* se realiza analizando las variaciones en el SNP rs12979860.

[112] El gen *KIR3DS1*, o también *killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, short cytoplasmic tail, 1* (*KIR-G1*; *NKAT10*; *CD158E2*; *KIR-123FM*) pertenece a los genes de la familia KIR, *killer cell immunoglobulin-like receptors* (*KIRs*), y son glicoproteínas transmembranales expresadas por las células natural killer y subconjuntos de células T. Los genes KIR son polimórficos y altamente homólogos, y se encuentran en un cluster en el cromosoma 19(19q13.4) en el complejo del receptor de leucocitos (LRC).

[113] En el contexto de la presente invención, *KIR3DS1* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

[114] a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

[115] b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

[116] c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

[117] d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *KIR3DS1*. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la SEQ ID NO: 2.

[118] En la presente invención 'pronóstico' se entiende como la evolución esperada de una enfermedad y se refiere a la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad así como a la valoración de su inicio, estado de desarrollo, evolución, o de su regresión, y/o el pronóstico del curso de la enfermedad en el futuro. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diag-

nosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

[119] Por 'predicción de la respuesta' se entiende, en el contexto de la presente invención, la determinación de la probabilidad de que el paciente responda de forma favorable o desfavorable a una terapia o a un tratamiento determinado. Especialmente, el término 'predicción', como se usa aquí, se refiere a una evaluación individual de cualquier parámetro que pueda ser útil en determinar la evolución de un paciente. Como entenderán los expertos en la materia, la predicción de la respuesta clínica al tratamiento, aunque se prefiere que sea, no necesita ser correcta para el 100% de los sujetos a ser diagnosticados o evaluados. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos como que tienen una probabilidad aumentada de tener una respuesta positiva. El experto en la materia puede determinar fácilmente si un sujeto es estadísticamente significativo usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de los valores de p, prueba t de Student, prueba de Mann Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 50%>, al menos del 60%>, al menos del 70%>, al menos del 80%>, al menos del 90%), al menos del 95%>. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1 ó 0,05. La predicción de la respuesta clínica se puede hacer utilizando cualquier criterio de valoración usado en oncología y conocido por el experto en la materia.

[120] A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos o tratamiento adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión

lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

[121] El término 'individuo', tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término 'individuo' no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

[122]

[123] **KIT O DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO, MICROARRAY Y USOS**

[124] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de aquí en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar el genotipo del gen *KIR3DS1*

[125] En otra realización preferida el kit puede contener oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm del gen *KIR3DS1* (SEQ ID NO: 1).

[126] Más preferiblemente, el kit de la invención comprende los oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5

[127] [Table 1]

Iniciador o cebador directo	Iniciador o cebador reverso
cat cgg ttc cat gat gcg (SEQ ID NO: 3)	cca cga tgt cca gggga (SEQ ID NO: 5)
cat cag ttc cat gat gcg (SEQ ID NO: 4)	

[128] Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar el genotipo del gen *KIR3DS1* por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

[129] Es también posible que el (los) oligonucleótido(s) o sondas estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de

ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, que normalmente corresponde a una secuencia concreta de ADN,. Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención.

- [130] Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende al menos una sonda para detectar el genotipo del gen *KIR3DS1*.
- [131] Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie de un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.
- [132] Así, las sondas oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos. Para la cuantificación de la expresión génica, preferiblemente se emplean aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.
- [133] La síntesis in situ sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.
- [134] Más preferiblemente, el kit o dispositivo, y/o el microarray además comprende una o varias sondas necesarias para detectar el haplotipo del gen *IL28B*
- [135] Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo, la micromatriz, o el microarray de la invención, para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina. En una realización preferida, el análogo de la guanosina es la ribavirina (RBV).
- [136] Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).
- [137] Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de

cualquiera de los métodos de la invención.

[138] Los términos 'polinucleótido' y 'ácido nucleico' se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA). Los términos 'secuencia aminoacídica', 'péptido', 'oligopéptido', 'polipéptido' y 'proteína' se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

[139] A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra 'comprende' y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

[140] **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

[141] **Fig. 1.** Declive viral del HCV para KIR3DS1 y sus ligandos en pacientes portadores de los genotipos IL28B-CC (**1A**) o IL28B no-CC (**1B**).

[142] **Fig. 2.** La HCV viral desciende significativamente en enfermos que poseen el gen *KIR3DS1* y su ligando *HLA-Bw4* en pacientes que poseen el genotipo IL28B-CC (**2A**) o IL28B non-CC genotipos (2B) durante las primeras horas del tratamiento con Peg-IFN/RBV

[143] **EJEMPLOS DE LA INVENCION**

[144] A continuación se ilustrará la invención mediante la exposición de los resultados obtenidos por los inventores. Estos ponen de manifiesto la especificidad y eficacia de la invención para obtener datos útiles en la predicción de la respuesta al tratamiento de individuos coinfectados con VIH y HCV.

[145] ***Pacientes***

[146] En el estudio prospectivo se han incluido pacientes con hepatitis C crónica, del genotipo 1, recibiendo terapia combinada de Peg-IFN/RBV. El criterio empleado para determinar la terapia de la hepatitis fue el seguido por las directrices internacionales (20). Se recogieron las características clínicas, virológicas y del hospedador. El estado de fibrosis se determinó mediante biopsia o elastografía hepática transitoria (FibroScan ®, Echosen, París). La fibrosis significativa se define como una fibrosis F3-F4 puntuación de METAVIR en la biopsia hepática o un valor de rigidez hepática de ≥ 11 kPa.

[147] ***Regímenes de tratamiento***

[148] Todos los individuos fueron tratados con Peg-IFN $\alpha 2$ a dosis de 180 μ g, combinada con una dosis de ribavirina ajustada al peso (1000 mg/día para <75 kg, 1200 mg/día

para ≥ 75 kg), en concordancia con las directrices internacionales (20), y completado al menos 4 meses de tratamiento.

[149] ***Evaluación virológica y la definición de la respuesta al tratamiento***

[150] Las cargas plasmáticas de ARN VHC ARN se midieron al inicio del estudio y en las semanas 1, 2 y 4, usando un ensayo de PCR cuantitativa (Cobas TaqMan, Roche Diagnostic Systems Inc., Pleasanton, CA, EE.UU.), con un límite de detección de 15 UI / ml.

[151] La respuesta virológica sostenida (SVR RVS) se define como un nivel indetectable de ARN del VHC en suero 24 semanas después de la finalización de la terapia del VHC. ARN del VHC indetectable en plasma del en la semana 4 se considera una respuesta virológica rápida (RVR).

[152] ***Genotipado de polimorfismos de nucleótido único (SNP)***

[153] Se extrajo el ADN utilizando el método de extracción de ADN automatizado MagNA Pure (Roche Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN 46250, EE.UU.). Se genotipó el SNP rs129679860, ubicado a 3 kilobases *upstream* de la IL28B y en linkage disequilibrium con una variante codificante no-sinónimo del gen IL28B (213A> G, K70R; rs81031142). El genotipado se llevó a cabo utilizando el acostumbrado ensayo TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), en ADN aislado a partir de las muestras de sangre total, utilizando un termociclador con Stratagene MX3005 MxPro software (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.), según instrucciones del fabricante. Los investigadores responsables de genotipado no tuvieron acceso a los datos de los pacientes. El genotipo IL28B se definió como CC o no-CC (TT / CT).

[154] ***Genotipado KIR***

[155] El genotipado *KIR* se realizó con cebadores específicos de secuencia capaces de detectar la presencia de 16 genes *KIR* diferentes utilizados previamente por Gómez-Lozano et al [21]. Este método proporciona un alto grado de resolución, ya que cada pareja de cebadores identifica dos sitios polimórficos vinculados, cis-ubicados (Invitrogen Corporation).

[156] ***Genotipado antígeno leucocitario humano (HLA)-B***

[157] La genotipificación HLA-B se realizó con el INNO-LiPA HLA-B Kit Multiplex (Innogenetics NV), utilizando primers múltiplex HLA-B para amplificación de ácido nucleico de los exones segundo a cuarto del locus HLA-B, y los primers HLA-Bw4 para el exón 2 de los alelos HLA-BW4. Este procedimiento está basado en el método de PCR-SSO reversa. Siguiendo alelos HLA-B y BW4 o Bw6 especificidades se determinaron con LIRASTM software para INNOLIPA HLA. Los pacientes portadores de la KIR3DS1 se definieron sobre la base de ligandos específicos Bw4 (KIR3DS1/Bw4) o Bw6 (KIR3DS1/Bw6) [22].

[158] ***Análisis estadístico***

[159] Las variables continuas se expresaron como media $\pm$ desviación estándar o la mediana y los cuartiles (Q1-Q3) y se analizaron mediante el test de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney U-test o el test de Kruskal-Wallis. Las variables categóricas se expresaron como número de casos (en porcentaje). Las frecuencias se compararon mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher. La significación se fijó a un valor de p menor de 0,05. Las reducciones en plasma de ARN del VHC fueron analizadas por IL28B y KIR3DS1 entre el inicio y la semana 1, semana 2 y a las 4 semanas. Las tasas de RVS y RVR se analizaron en términos de los genotipos KIR3DS1 y IL28B. Para los fines de este análisis, se evaluó la SVR en el enfoque del tratamiento, con exclusión de aquellos que voluntariamente abandonaron o interrumpieron el tratamiento debido a eventos adversos. Se realizó un modelo de regresión lineal de la disminución viral del VHC desde el inicio hasta semanas 1, 2 y 4.

[160] El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 18.0 (IBM Corporation, Somers, NY, EE.UU.).

[161] ***Aspectos éticos***

[162] El estudio se diseñó y llevó a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki y aprobado por el comité ético del Hospital Reina Sofía, Córdoba, España. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado antes de participar en el estudio.

[163] **RESULTADOS**

[164] ***Características basales de los pacientes***

[165] Sesenta pacientes coinfectados por VIH / VHC de genotipo 1 fueron incluidos en este estudio prospectivo. Las características basales se muestran en la Tabla 1. 21 (35%) pacientes portaban el genotipo IL28B-CC y 39 (65%), el genotipo IL28B no CC.

[166] Veinticuatro (40%) pacientes tuvieron KIR3DS1, y 36 (60%) no. Entre los pacientes con KIR3DS1, 13 (54,1%) tenían ligando específico Bw4 y

[167] 11 (45,9%) Bw6. La distribución de KIR3DS1 y su ligandos por genotipo IL28B se muestra en la Tabla 2. En nuestro estudio, todos los pacientes IL28B-CC con KIR3DS1 tenían el ligando específico Bw4, mientras que sólo el 38,8% IL28B de no-CC pacientes portadores de KIR3DS1 tenía este ligando ($p = 0,016$).

[168] ***Influencia de KIR3DS1 y IL28B en descenso viral del VHC***

[169] Como se muestra en la Figura 1, los pacientes con KIR3DS1 y ligando específico Bw4 mostraron una mayor disminución viral del VHC que aquellos que no lleva KIR3DS1 o con KIR3DS1/Bw6 en la semana 1 (KIR3DS1/Bw4: $1,47 \pm 0,49$; KIR3DS1/Bw6: $0,508 \pm 0,41$; No KIR3DS1: $0,48 \pm 0,37$ UI log10/ml, $p = 0,01$), la semana 2 (KIR3DS1/Bw4: $1,82 \pm 0,47$; KIR3DS1/Bw6: $1,29 \pm 0,61$; No KIR3DS1: $0,77 \pm 0,49$ UI log10/ml, $p = 0,038$) y la semana 4 (KIR3DS1/Bw4: $2,53 \pm 0,56$;

KIR3DS1/Bw6: $1,71 \pm 0,74$; No KIR3DS1: $1,47 \pm 0,81$ UI log10/ml, $p = 0,03$). Un punto clave de los resultados es que no se encontraron diferencias en ninguno de los puntos de tiempo analizados entre los pacientes portadores de KIR3DS1/Bw6 y los que no tienen KIR3DS1 (semana1: $p = 0,527$; Semana2: $p = 0,173$; 4 semanas: $p = 0,358$) (Fig. 1).

- [170] Los portadores del genotipo IL28-CC mostraron una mayor reducción de los niveles plasmáticos de ARN del VHC que los no portadores del genotipo CC en cada momento analizado (semana 1: $0,98 \pm 0,72$ frente a $0,39 \pm 0,51$ UI log10/ml, $p = 0,017$; semana 2: $1,67 \pm 0,81$ frente a $0,83 \pm 0,77$ UI log10/ml, $p = 0,028$; 4 semanas: $2,28 \pm 0,62$ frente a $1,47 \pm 1,06$ UI log10/ml, $p = 0,037$).
- [171] ***Influencia del genotipo tanto IL28B como KIR3DS1 en el aclaramiento viral del VHC***
- [172] Entre los portadores del genotipo IL28B-CC, los que tienen KIR3DS1/Bw4 tenían mayores tasas de aclaramiento viral del VHC que aquellos que KIR3DS1 no eran portadoras (semana 1: $2,51 \pm 0,67$ frente a $0,501 \pm 0,41$ UI log10/ml, $p < 0,001$, semana 2: $2,82 \pm 0,73$ frente a $1,39 \pm 0,72$ UI log10/ml, $p = 0,01$; 4 semanas: $3,62 \pm 0,78$ frente a $1,98 \pm 0,98$ UI log10/ml, $p = 0,02$) (Fig. 2A). Sin embargo, entre los pacientes de genotipo IL28B no-CC, se hubo diferencias de aclaramiento viral del VHC entre los que llevan a KIR3DS1/Bw4 y los que no están llevando KIR3DS1/Bw4 (semana 1: $0,78 \pm 0,57$ frente a $0,41 \pm 0,39$ UI log10/ml, $p = 0,476$; semana 2: $1,01 \pm 0,67$ frente a $1,03 \pm 0,82$ UI log10/ml, $p = 0,699$; 4 semanas: $1,97 \pm 0,86$ frente a $1,51 \pm 0,84$ UI log10/ml, $p = 0,755$) (Fig. 2B)
- [173] Cuando la eliminación del virus HCV se comparó en pacientes portadores KIR3DS1/Bw4, aquellos con el genotipo IL28B-CC tenían tasas más altas de disminución viral que aquellos con la IL28B no genotipo CC (semana 1: $p < 0,001$, semana 2: $p = 0,03$; 4 semanas: $p = 0,037$). Por otro lado, cuando se comparó a pacientes que no portaban KIR3DS1/Bw4, no hubo diferencias en la eliminación del virus VHC en las primeras semanas de tratamiento en el base de genotipo IL28B (semana 1: $p = 0,827$; semana 2: $p = 0,725$; 4 semanas: $p = 0,429$).
- [174] Los modelos de regresión lineal de disminución viral del VHC desde el inicio hasta las semanas 1, 2 y 4 se muestran en la Tabla 3.
- [175] ***Tratamiento de la tasa de respuesta***
- [176] Once (18,3%) pacientes abandonaron el tratamiento debido al abandono de la terapia o un acontecimiento adverso. Los pacientes portadores de KIR3DS1/Bw4 lograron mayores tasas de RVR y de RVS que los que no portaban KIR3DS1/Bw4 (RVR: 6 [46,15%] frente a 8 [17,02%], $p = 0,012$; SVR: 7 [63,6%] frente a 13 [26,5%], $p = 0,031$). Los pacientes con el genotipo IL28B-CC mostraron tasas más altas de RVR y RVS que los que tienen el IL28B no genotipo CC (RVR: 8 [38,01%] versus 5 [12,8%],

p = 0,03; SVR: 10 [55,5%] frente a 10 [32,2%], p = 0,027) RVR y las tasas de RVS según el genotipo IL28B y la presencia de KIR3DS1 se muestran en la Tabla 4.

Texto libre de lista de secuencias

Sequence List Text

[177] <110> UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
 [178] SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
 [179] <120> Método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta
 [180] al tratamiento de la Hepatitis C.
 [181] <130> FIBICO-72
 [182] <160> 6
 [183] <170> PatentIn version 3.5
 [184] <210> 1
 [185] <211> 382
 [186] <212> PRT
 [187] <213> Homo sapiens
 [188] <400> 1
 [189] Met Leu Leu Met Val Val Ser Met Ala Cys Val Gly Leu Phe Leu Val
 [190] 1 5 10 15
 [191] Gln Arg Ala Gly Pro His Met Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
 [192] 20 25 30
 [193] Ala Trp Pro Ser Ala Val Val Pro Arg Gly Gly His Val Thr Leu Arg
 [194] 35 40 45
 [195] Cys His Tyr Arg His Arg Phe Asn Asn Phe Met Leu Tyr Lys Glu Asp
 [196] 50 55 60
 [197] Arg Ile His Val Pro Ile Phe His Gly Arg Ile Phe Gln Glu Gly Phe
 [198] 65 70 75 80
 [199] Asn Met Ser Pro Val Thr Thr Ala His Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Arg
 [200] 85 90 95
 [201] Gly Ser His Pro His Ser Pro Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
 [202] 100 105 110
 [203] Met Val Ile Met Val Thr Gly Asn His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
 [204] 115 120 125
 [205] His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Gly Glu Arg Val Ile Leu Gln Cys
 [206] 130 135 140
 [207] Trp Ser Asp Ile Met Phe Glu His Phe Phe Leu His Lys Glu Trp Ile
 [208] 145 150 155 160
 [209] Ser Lys Asp Pro Ser Arg Leu Val Gly Gln Ile His Asp Gly Val Ser

[210] 165 170 175
[211] Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Ser Met Met Arg Ala Leu Ala Gly Thr
[212] 180 185 190
[213] Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Thr Pro Tyr Gln Leu Ser Ala
[214] 195 200 205
[215] Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Val Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro
[216] 210 215 220
[217] Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Lys Val Gln Ala Gly Glu Ser Val
[218] 225 230 235 240
[219] Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser
[220] 245 250 255
[221] Arg Glu Gly Gly Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Val Arg Lys Val
[222] 260 265 270
[223] Asn Arg Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly
[224] 275 280 285
[225] Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg His Ser Pro Tyr Glu Trp
[226] 290 295 300
[227] Ser Asp Pro Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser
[228] 305 310 315 320
[229] Ser Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Ser Gly Asn Leu
[230] 325 330 335
[231] Arg His Leu His Ile Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe
[232] 340 345 350
[233] Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys
[234] 355 360 365
[235] Lys Cys Cys Cys Asn Gly Pro Arg Ala Cys Arg Glu Gln Lys
[236] 370 375 380
[237] <210> 2
[238] <211> 1741
[239] <212> DNA
[240] <213> Homo sapiens
[241] <400> 2
[242] ccggcagcac catgtgctc atggctgca gcatggcgtg tgttgggttg ttcttggtcc 60
[243] agagggccgg tccacacatg ggtggtcagg acaagccctt cctgtctgcc tggcccagcg 120
[244] ctgtggtgcc tcgcggagga cactgactc ttcggtgtca ctatcgtcat aggtttaaca 180
[245] atttcagtct atacaaagaa gacagaatcc acgttcccat ctccatggc agaattattcc 240
[246] aggagggtt caacatgagc cctgtgacca cagcacatgc aggggaactac acatgtcggg 300
[247] gttcacacc acactcccc actgggtggt cggaaccag caaccccatg gtgatcatgg 360

[248] tcacaggaaa ccacagaaaa ccttccctcc tggcccaccc aggtcccctg gtgaaatcag 420
 [249] gagagagagt catcctgcaa tgttggtcag atatcatgtt tgagcacttc ttctgcaca 480
 [250] aagagtggat ctetaaggac cctcaccgcc tegtggaca gatecatgat ggggtctcca 540
 [251] agggcaattt cctcatcggg tccatgatgc gtgcccttgc agggacctac agatgctacg 600
 [252] gttctgttac tcacaccccc tatcagttgt cagctcccag tgatcccctg gacatcgtgg 660
 [253] tcacaggctt atatgagaaa ccttctctct cageccagcc gggccccaag gttcaggcag 720
 [254] gagagagegt gacctgtcc ttagctccc ggagctccta tgacatgtac catctatcca 780
 [255] gggagggggg agcccatgaa cgtaggtccc ctgcagtgcg caaggtcaac agaacattcc 840
 [256] aggcagattt cctctgggc cctgccccc acggaggggac ctacagatgc ttcggtctt 900
 [257] tccgtcactc tccctacgag tggtcagacc cgagtgaccc actgcttgtt tctgtcacag 960
 [258] gaaaccttc aagtagttgg cctcaccca cagaaccaag ctccaaatct ggtaacctca 1020
 [259] gacacctgca cattctgatt gggacctcag tggtaaaaat cctttcacc atctctctct 1080
 [260] tctttctct tcatcgtgg tctccaaca aaaaaaatg ctgctgtaat ggaccaagag 1140
 [261] cctgcaggga acagaagtga acagcgagga ttctgatgaa caagaccatc aggaggtgtc 1200
 [262] atacgcataa ttggaacact gtgtttcac acagagaaaa atcactgcc cttctcagag 1260
 [263] gccaagaca ccccaacag ataccagcat gtacatagaa cttccaaatg ctgagcccag 1320
 [264] atccaaagt gtctctgtc cagcagcacc acagtcaggc cttgagggga tctctaggg 1380
 [265] agacaacagc cctgtctcaa aactgggttg ccagctccca tgtaccagca gctggaatct 1440
 [266] gaaggcatca gtctcatct tagggcatcg ctctctctca caccacaaat ctgaatgtgc 1500
 [267] ctctcacttg cttacaaatg tctaaggctc cactgctg ctggagaaaa aacacactcc 1560
 [268] ttgcttagc ccacagttct ccatttact tgaccctgc ccactctcc aacctactg 1620
 [269] gcttacttcc tagtctact gaggtgcaa tcacactgag gaactcaca tccacacat 1680
 [270] acaagggtc cgtcttaac gcagcactta gacagtgct gttccacctt cctcatgct 1740
 [271] g 1741
 [272] <210> 3
 [273] <211> 18
 [274] <212> DNA
 [275] <213> Artificial Sequence
 [276] <220>
 [277] <223> iniciador o cebador directo
 [278] <400> 3
 [279] catcggttcc atgatgcg 18
 [280] <210> 4
 [281] <211> 18
 [282] <212> DNA
 [283] <213> Artificial Sequence
 [284] <220>
 [285] <223> Iniciador o cebador directo

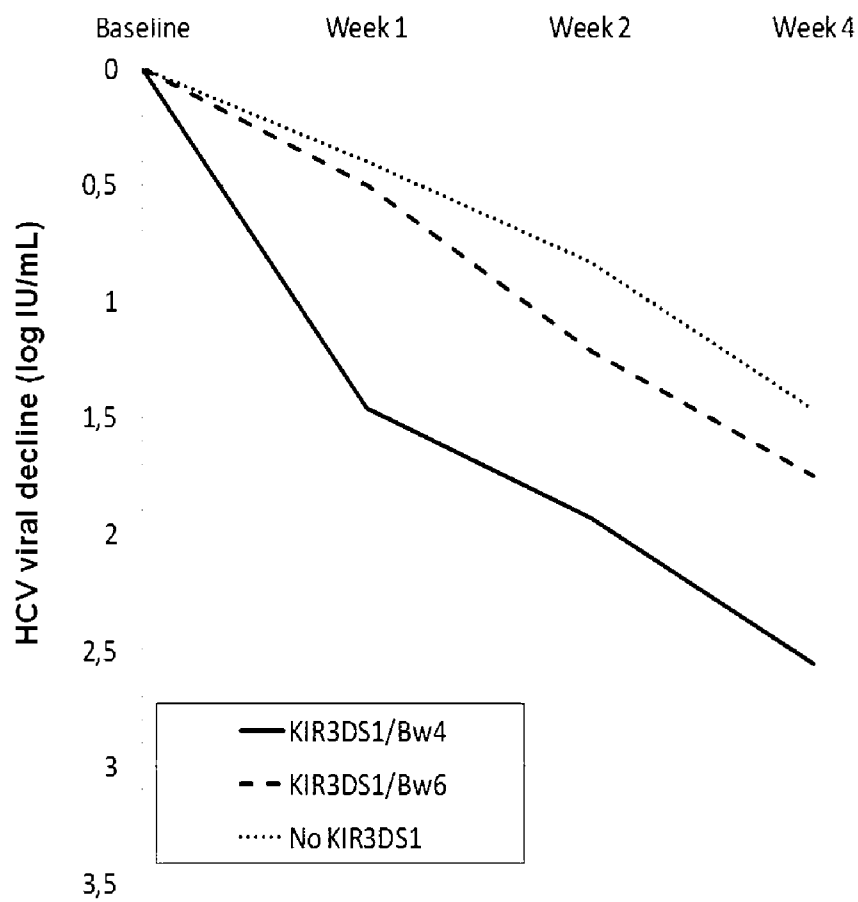
- [286] <400> 4
- [287] catcagttcc atgatgcg 18
- [288] <210> 5
- [289] <211> 17
- [290] <212> DNA
- [291] <213> Artificial Sequence
- [292] <220>
- [293] <223> Iniciador o cebador indirecto
- [294] <400> 5
- [295] ccacgatgtc cagggga 17
- [296] <210> 6
- [297] <211> 52
- [298] <212> DNA
- [299] <213> Homo sapiens
- [300] <400> 6
- [301] ctgaaccagg gagtccccg aaggcgygaa ccagggttga attgcactcc gc 52

Reivindicaciones

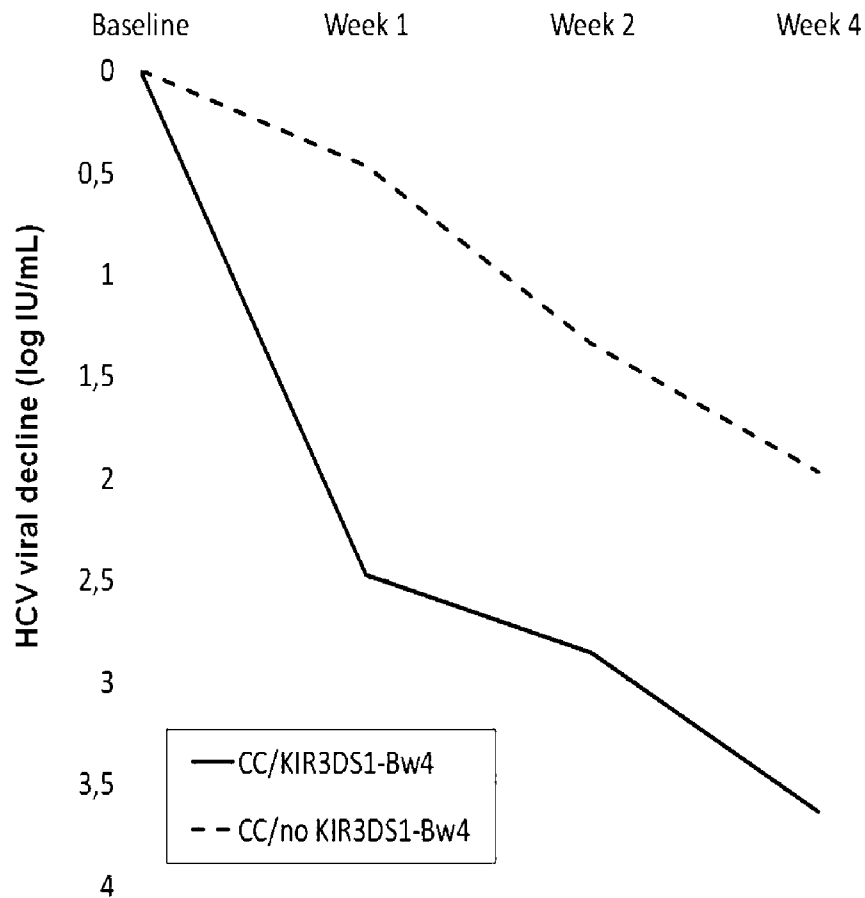
- [Reivindicación 1] El uso del gen *KIR3DS1* para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina.
- [Reivindicación 2] El uso del gen *KIR3DS1* según la reivindicación anterior, donde el análogo de guanosina es la ribavirina (RBV).
- [Reivindicación 3] El uso del gen *KIR3DS1* según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el individuo está coinfectado por el VIH y el VHC.
- [Reivindicación 4] El uso del gen *KIR3DS1* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el VHC es del genotipo 1.
- [Reivindicación 5] El uso del gen *KIR3DS1* según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en combinación con el gen *IL28B*.
- [Reivindicación 6] Un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la RVS al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:
- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 - b) detectar el genotipo del gen *KIR3DS1*, en la muestra aislada de (a).
- [Reivindicación 7] El método según la reivindicación anterior, que comprende detectar el genotipo del gen *KIR3DS1*, y además el de su ligando *Bw4*, en la muestra aislada de (a).
- [Reivindicación 8] Un método para predecir o pronosticar la Respuesta Viral Sostenida (RVS) al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina, que comprende los pasos (a) y (b) cualquiera de las reivindicaciones 6-7, y además comprende:
- c) clasificar a los individuos que presentan el genotipo *KIR3DS1*, en el grupo de pacientes buenos respondedores al tratamiento o con un mejor pronóstico.
- [Reivindicación 9] Un método para predecir o pronosticar la Respuesta Viral Sostenida al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina, que comprende los pasos (a) y (b) cualquiera de las reivindicaciones 6-7, y además comprende:
- c) clasificar a los individuos que presentan el genotipo *KIR3DS1*, y su ligando *Bw4*, en el grupo de pacientes buenos respondedores al tratamiento o con un mejor pronóstico.
- [Reivindicación 10] El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde el análogo de la guanosina es la ribavirina (RBV).

- [Reivindicación 11] El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el individuo está coinfectado por el VIH y el VHC.
- [Reivindicación 12] El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-11, donde el VHC es del genotipo 1.
- [Reivindicación 13] El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, que además comprende determinar el genotipo del gen *IL28B*.
- [Reivindicación 14] El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-13, donde la determinación del genotipo de *KIR3DS1* se realiza mediante PCR.
- [Reivindicación 15] El método según la reivindicación anterior, donde la PCR se lleva a cabo empleando los cebadores de secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5.
- [Reivindicación 16] El método según la reivindicación 14, donde la PCR se lleva a cabo empleando los cebadores de secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
- [Reivindicación 17] El método según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde la determinación del genotipo de *IL28B* se realiza analizando el SNP rs12979860.
- [Reivindicación 18] El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-17, donde el análogo de la guanosina es la ribavirina (RBV).
- [Reivindicación 19] El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-18, donde la muestra biológica es o se obtiene de sangre periférica.
- [Reivindicación 20] Un kit o dispositivo que comprende una o varias secuencias nucleotídicas necesarias para detectar el genotipo del gen *KIR3DS1*.
- [Reivindicación 21] El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, o los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5.
- [Reivindicación 22] El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 20-21, que además comprende una o varias sondas necesarias para detectar el genotipo del gen *IL28B*.
- [Reivindicación 23] El uso de un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 20-22, para predecir o pronosticar la respuesta de un individuo al tratamiento del VHC con IFN-Peg más un análogo de guanosina.
- [Reivindicación 24] El uso de un kit o dispositivo según la reivindicación anterior, donde el análogo de la guanosina es la ribavirina (RBV).

[Fig. 1]



[Fig. 2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

A61K38/21 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010076788 A2 (YISSUM RES DEV CO ET AL.)	1-24
Y	08/07/2010, the whole document.	2-24
Y	PINEDA JUAN A ET AL., "Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus".Clinical infectious diseases (2010), VOL: 51, No: 7, Pags: 788 - 795, the whole document.	2-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27/02/2014

Date of mailing of the international search report
(07/03/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Hernandez Cuellar

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070938

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LOPEZ-VAZQUEZ ANTONIO ET AL., "Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection".Journal of Infectious Diseases (2005), VOL: 192, No: 1, Pags: 162-165 the whole document.	7-24
Y	SUPPIAH VIJAYAPRAKASH ET AL., "IL28B, HLA-C, and KIR Variants Additively Predict Response to Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection in a European Cohort: A Cross-Sectional Study".PLos Medicine (2011), VOL: 8, No: 9, Pags: Article No.: e1001092, Doi: doi:10.1371/journal, the whole document.	6-24
Y	WO 2011035870 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH ET AL.) 31/03/2011, the whole document.	6-24
Y	VILCHES C ET AL., "Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: An update", Tissue Antigens (2002), VOL, 59, Págs 184–193, the whole document.	6-24
X	HONG H A ET AL., "Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping and HLA killer-cell immunoglobulin-like receptor-ligand identification by real-time polymerase chain reaction".Tissue Antigens (2011), VOL: 78, No: 3, Pags: 185-194, the whole document.	20-21
Y		6-19,22-24
P,X	RIVERO-JUAREZ ANTONIO ET AL., "Natural killer KIR3DS1 is closely associated with HCV viral clearance and sustained virological response in HIV/HCV patients"PloS one (2013), VOL: 8, No: 4 Pags: e61992 doi:10.1371/journal.pone.0061992 the whole document.	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070938

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2013/070938

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2010076788 A2	08.07.2010	US2012009148 A1 EP2376653 A2	12.01.2012 19.10.2011
-----	-----	-----	-----
WO2011035870 A1	31.03.2011	US2011129830 A1 JP2013505027 A EP2480683 A1 CN102575292 A CA2770143 A1	02.06.2011 14.02.2013 01.08.2012 11.07.2012 31.03.2011
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070938

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)

A61K38/21 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2010076788 A2 (YISSUM RES DEV CO ET AL.)	1-24
Y	08/07/2010, todo el documento.	2-24
Y	PINEDA JUAN A ET AL., "Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus".Clinical infectious diseases (2010), VOL: 51, No: 7, Pags: 788 - 795, todo el documento.	2-24

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
27/02/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
07 de marzo de 2014 (07/03/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Hernandez Cuellar
Nº de teléfono 91 3498409

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/070938

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	LOPEZ-VAZQUEZ ANTONIO ET AL., "Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection".Journal of Infectious Diseases (2005), VOL: 192, No: 1, Pags: 162-165 todo el documento.	7-24
Y	SUPPIAH VIJAYAPRAKASH ET AL., "IL28B, HLA-C, and KIR Variants Additively Predict Response to Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection in a European Cohort: A Cross-Sectional Study".PLOS Medicine (2011), VOL: 8, No: 9, Pags: Article No.: e1001092, Doi: doi:10.1371/journal.pmed.1001092	6-24
Y	WO 2011035870 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH ET AL.) 31/03/2011, todo el documento.	6-24
Y	VILCHES C ET AL., "Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: An update", Tissue Antigens (2002), VOL, 59, Págs 184-193, todo el documento.	6-24
X	HONG H A ET AL., "Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping and HLA killer-cell immunoglobulin-like receptor-ligand identification by real-time polymerase chain reaction".Tissue Antigens (2011), VOL: 78, No: 3, Pags: 185-194, todo el documento.	20-21
Y		6-19,22-24
P,X	RIVERO-JUAREZ ANTONIO ET AL., "Natural killer KIR3DS1 is closely associated with HCV viral clearance and sustained virological response in HIV/HCV patients"PloS one (2013), VOL: 8, No: 4 Pags: e61992 doi:10.1371/journal.pone.0061992 todo el documento.	1-24

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/070938

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

- 1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:
- a. Medios
- ☐ en papel
- ☒ en formato electrónico
- b. Cuando
- ☐ en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☒ junto con la solicitud internacional en formato electrónico
- ☐ posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070938

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2010076788 A2	08.07.2010	US2012009148 A1 EP2376653 A2	12.01.2012 19.10.2011
-----	-----	-----	-----
WO2011035870 A1	31.03.2011	US2011129830 A1 JP2013505027 A EP2480683 A1 CN102575292 A CA2770143 A1	02.06.2011 14.02.2013 01.08.2012 11.07.2012 31.03.2011
-----	-----	-----	-----