

CONVOCATORIA DE AYUDAS DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
MEMORIA DE SOLICITUD

Expediente N°  
PI 15/0856

**TITULO:** Búsqueda de posibles dianas terapéuticas en la región del gen x del virus de la hepatitis B en base al estudio de conservación de dicha región mediante secuenciación masiva

**INVESTIGADOR/A PRINCIPAL:** Dr Francisco Rodriguez-Frías

**TIPO DE PROYECTO:**  INDIVIDUAL  COORDINADO  MULTICÉNTRICO

**NOMBRE DEL IP COORDINADOR:**

(Cumplimentar sólo en caso de proyectos coordinados)

**DURACION:**  3 AÑOS

**RESUMEN (Objetivos y Metodología del Proyecto)**

(Ajústese al espacio disponible)

**Objetivos** (1) Estudiar las diferentes poblaciones virales con mutaciones por sustituciones, inserciones y/o deleciones, en las regiones promotora y codificante del la proteína HBX del virus de la hepatitis B (VHB) y (2) analizar la complejidad de las quasispecies del VHB, mediante diferentes parámetros (Entropía de Shannon, índice de Gini-Simpson, frecuencia de mutación, diversidad nucleotídica, etc). Ambos objetivos, tienen la finalidad de establecer el posible valor pronóstico de mutaciones o de la complejidad de la quasispecies como marcadores de severidad de la enfermedad hepática. (3) Definir zonas hiperconservadas en el gen X y su promotor, potencialmente útiles como dianas para su bloqueo mediante terapia génica dirigida.

**Metodología** Selección prospectiva de 90 pacientes con infección crónica por VHB que acuden a consultas del hospital Vall d'Hebron y que firmen consentimiento informado. Se buscaran muestras retrospectivas que cumplan el interés del estudio y se recopilarán datos demográficos y clínicos en una base de datos anonimizada. Se incluirán 30 portadores del VHB (grupo A), 40 pacientes con hepatitis crónica (grupo B) y 20 pacientes con cirrosis por VHB (grupo C). Se analizarán dos muestras por paciente y dos regiones del gen x por muestra (región codificante, nt 1374-1838 y región promotora, nt 1255-1390). La secuenciación masiva de las dos regiones implicará un análisis de 6.000.000 de secuencias. Se evaluará "in vitro" (cultivo celular) la esencialidad para la replicación del VHB de las zonas más conservadas de las regiones codificante y promotora del gen X (modificaciones por mutagénesis dirigida).

**TITLE:** Therapeutic targeting search based on the conservation of hepatitis B virus x gene by massive sequencing methodology

**ABSTRACT (Objectives and Methodology of the project)**

**Objectives** (1) Study viral populations with point mutations, insertions and/or deletions in the promoter and the x gene of hepatitis B virus (HBV) and (2) analyze HBV quasispecies by several parameters (Shannon Entropy, Gini-Simpson, mutation frequency, nucleotide diversity, etc). Both objectives aim to establish the possible pronostic value of mutations (1) or quasispecies complexity (2) as markers of liver disease severity. (3) Define hiperconserved regions in the promoter and the x gene that might be useful as gene targeting.

**Methodology** Prospective selection of 90 patients with HBV infection that are visited and controlled in Vall d'Hebron hospital, and with informed consent signed. Demographic and clinical data will be retrospectively recorded in an anonymously data base. Thirty HBV carriers (group A), 40 patients with chronic hepatitis (group B) and 20 patients with cirrhosis (group C) will be included. Two samples/patient will be included. Two regions of the HBV genome will be ultra-deep pyrosequenced: the coding region (nucleotide positions 1374-1838) and the promoter (nucleotide positions 1255-1390). A total of 6.000.000 sequences will be obtained. The replicative capacity of the most conserved regions will be assesed "in vitro".

Expediente Nº  
PI 15/0856

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr Francisco Rodríguez-Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
SECCIÓN ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Finalidad del proyecto, antecedentes y estado actual de los conocimientos científico-técnicos, grupos nacionales o internacionales que trabajan en la línea específica del proyecto o en líneas afines.

Citar las referencias en el apartado siguiente: Bibliografía más relevante.

Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)

**FINALIDAD DEL PROYECTO**

Estudio de la complejidad de la quasispecies de la región codificante de la proteína X del Virus de la Hepatitis B y su promotor, en diferentes situaciones de enfermedad hepática (cirrosis y diferentes fases de hepatitis crónica B) y de tratamiento, para evaluar si éstas podrían ser dianas útiles para interferir en el ciclo del virus y conseguir la curación de la infección crónica por VHB. Además, se estudiara si las inserciones o deleciones en esta región tienen implicaciones clínico-patológicas.

**ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS CIENTÍFICO TÉCNICOS**

A pesar del desarrollo de programas de vacunación (anti-HB) y de terapias antivirales efectivas, la Hepatitis B Crónica (HBC) sigue siendo un problema grave de salud a nivel mundial. Se estima que más de 240 millones de personas están infectadas crónicamente por el Virus de la Hepatitis B (VHB) en todo el mundo<sup>1</sup>. Además, estos pacientes tienen un alto riesgo (25%) de desarrollar cirrosis (CH) y Hepatocarcinoma (HCC) del que la infección por VHB es la causa mayoritaria<sup>2</sup>. De hecho, la infección por VHB es responsable de aproximadamente 780.000 muertes anuales<sup>1</sup>.

El VHB, perteneciente a la familia *Hepadnaviridae*, es un pequeño virus con envuelta de organización genómica y mecanismo de replicación muy singulares. El genoma del virus está compuesto de ADN circular (3,2 kb), parcialmente de doble cadena que contiene cuatro pautas de lectura abierta (ORF): P, preC/C, preS/S y X. El molde de transcripción del virus es el ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) que reside en el núcleo del hepatocito como un minicromosoma. El mantenimiento del ADNccc es clave para la persistencia del virus. La replicación de VHB implica la transcripción inversa del ARN pregenómico intermediario del ADN viral, pero la transcriptasa inversa es propensa a errores y el ratio de mutación es alto<sup>3</sup>. Esta variabilidad conduce a una acumulación de secuencias genómicas formando una población viral heterogénea o quasispecies<sup>3</sup> que le permite escapar del sistema inmune del huésped, así como al tratamiento por inhibidores de nucleós(t)idos de polimerasa y/o a la vacunación anti-HB, acelerando la progresión a HBC<sup>4</sup>.

Los programas de prevención, la vacuna anti-HB y los tratamientos disponibles (análogos de nucleos(t)idos, AN), basados en la inhibición de la replicación viral, han conseguido disminuir notablemente el número de infectados o frenar la progresión de la enfermedad (fibrosis hepática y aparición de hepatocarcinoma)<sup>5</sup>. Sin embargo, estos tratamientos tienen limitaciones, como la aparición de resistencias y a la necesidad de una administración continuada probablemente de por vida<sup>6</sup>; ya que la replicación viral se recupera tras suspender el tratamiento, fenómeno observado en los proyectos **Pi 11/1973 y Pi 12/1893** (manuscrito en revisión). Por lo tanto, la eliminación completa o cura de esta infección no es posible con los tratamientos actuales. Por ello, parece ser que el objetivo principal para el desarrollo de nuevas terapias en la infección crónica por el VHB es profundizar en el conocimiento de las interacciones virus-huésped que conducen a la infección persistente y una mejor comprensión de los obstáculos para su cura. Una de las explicaciones más plausibles es la persistencia del ADNccc en el núcleo del hepatocito<sup>7</sup>; así, no es detectado por el sistema inmune del huésped ni atacado ni por los AN ni por el IFN, de manera que actúa como reservorio y por tanto puede producirse un rebrote virológico tras la discontinuación del tratamiento o incluso en pacientes con infecciones por hepatitis B que se asumían como resueltas (HBsAg negativo, anti-HBc positivo) si son sometidos a estados de inmunosupresión<sup>6</sup>. Por otra parte, las mutaciones que confieren resistencia a los tratamientos también quedan almacenadas en el ADNccc y podrían ser seleccionadas rápidamente con el uso de drogas que exhiban resistencia cruzada<sup>8</sup>. Este último fenómeno se ha observado como resultado del proyecto **PI09/0899** así como en pacientes trasplantados hepáticos en el **PI12/1893** (manuscrito en revisión final).

Las nuevas estrategias terapéuticas pueden ir dirigidas o a la respuesta inmunitaria del huésped: activando la respuesta innata (receptores TLR y RLR; células NK y NKT)<sup>9</sup> o restaurando la respuesta adaptativa específica a VHB, la cual se altera por el agotamiento de las células T frente a la exposición prolongada a grandes cantidades de antígeno viral. Así, se ha observado que la reducción de HBsAg y carga viral mejoran la respuesta inmunitaria adaptativa<sup>10</sup>. Y también pueden ir dirigidas a actividades celulares relacionadas con el ciclo viral. En la Hepatitis C y en el VIH se utilizan terapias combinadas dirigidas a distintas funciones del virus; sin embargo, en la HCB, la utilización de varios AN y peg-IFN $\alpha$  no tiene beneficios clínicos. Actualmente se están estudiando componentes que inhiben bien la entrada del VHB en los hepatocitos bloqueando el receptor celular (NTCP), la actividad de la enzima RNasa H, o el ensamblaje de las nucleocapsidas<sup>9</sup>. Todos ellos en fase de estudio preclínico. Sin embargo, la experiencia acumulada con el propio VHB, así como los tratamientos recientes frente a la infección por VHC parecen indicar que son más recomendables aquellas terapias dirigidas contra dianas específicamente virales. En este sentido, se está investigando

sobre los ARN de interferencia (ARNi) que regulan la expresión de genes concretos, inhibiendo el ARNm del virus, y la replicación de VHB y VHC en cultivo celular y en modelos de ratón<sup>11-13</sup>. Mc Caffrey et al<sup>12</sup> observaron que la expresión de ARNi disminuyó el HBsAg secretado en suero, se redujeron los niveles de ARN y de ADN (hasta niveles indetectables) del VHB en el hígado de ratón, y el número de células teñidas para el antígeno core del VHB fue menor. Así, los ARNi pueden ser utilizados como un nuevo enfoque terapéutico, sin embargo, son necesarios estudios que demuestren su eficacia 'in vivo', estabilidad del ARN y si existen efectos fuera de la diana para ser utilizados en el tratamiento de pacientes con Hepatitis.

De manera más ambiciosa se están desarrollando terapias dirigidas concretamente a erradicar o inactivar el propio "minicromosoma viral" ADNccc de las células infectadas o silenciar permanentemente su transcripción. En este sentido, hay estudios con nucleasas que cortan la molécula de ADN en un sitio específico del genoma y editan defectos genéticos, pudiendo inhibir la transcripción, como por ejemplo las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALENs) y las nucleasas guiadas por ARN (CRISPR-Cas9). Estas son herramientas, actualmente, bien establecidas tanto 'in vitro' como 'in vivo', pero las limitaciones de estas nucleasas como la posibilidad de tener otras dianas de acción, así como la posible toxicidad y la dudosa eficacia requiere de más estudios así como el avance en otros tipos de enzimas programables en ingeniería genética<sup>14</sup>. Recientemente, se ha analizado en fase 2 el efecto de un ARN corto de interferencia (siRNA) como posible tratamiento de la infección crónica por VHB<sup>15</sup>. A pesar que este estudio preliminar no define la región del genoma viral en que hibrida el siRNA, los pacientes tratados toleraron muy bien el tratamiento y presentaron una reducción significativa de la cuantificación del HBsAg.

Así, un factor importante para que la terapia génica sea efectiva y lo más universal posible, dada la gran prevalencia y heterogeneidad de esta infección a nivel virológico (10 genotipos y tasas de variabilidad intra e intergenotípica muy elevadas), y para evitar "fenómenos de escape", análogos a los observados en las terapias convencionales de la HCB, estas dianas deben ser aquellos motivos más esenciales para el ciclo viral y en ellos las secuencias más conservadas.

Hay que tener en cuenta que la totalidad del genoma del VHB es codificante y que además contiene algunos elementos reguladores de la replicación viral, uno de ellos es el enhancer II (ENH II), localizado entre las posiciones 1627 y 1774, en la región del gen X (posiciones 1374 a 1838), y modula directamente los promotores de la transcripción viral de ARNm asociados al proceso replicativo (ARNm core, ARNm precore y ARN pregenómico), controla en "trans" la transcripción de los demás ARNm virales y es el principal responsable del tropismo hepático de este virus. Debido a su esencialidad esta región podría ser la candidata ideal como diana terapéutica. Sin embargo, en el proyecto de nuestro grupo, actualmente en curso (**PI12/1893**), se está analizando la región 3' de ENH II<sup>16</sup> se ha observado una sorprendente variabilidad en esta región en el 94% de los pacientes estudiados y con proporciones significativas de variantes con inserciones y/o deleciones, habiéndose detectado más de 100 nuevas variantes de este tipo, que modificarían potencialmente la actividad transcripcional de esta región, así como otras interacciones esenciales con proteínas celulares como con DDB1 (manuscrito en preparación, **PI12/1893**). Esta gran complejidad, observada independientemente de si el paciente está o no en tratamiento (manuscritos en redacción) podría tener efecto sobre las regiones con las que se solapa (gen X, precore y promotor básico del core o PBC) (resultados preliminares<sup>17</sup>) dando posibles nuevas versiones del gen X, cuyo conocimiento en profundidad puede ser de gran relevancia para el abordaje terapéutico de esta "infección considerada actualmente incurable".

La proteína del gen X (HBx) es utilizada como diana debido a su esencialidad en el ciclo viral. De hecho, la expresión de HBx afecta a diversas funciones celulares en células transfectadas, como en la regulación citoplasmática del calcio, la señalización celular, la transcripción, la proliferación celular, la reparación del ADN y en la apoptosis. El HBx interactúa con otros elementos celulares, como las proteínas nucleares involucradas en la regulación de la transcripción y factores de transcripción. Además, también se asocia con la inhibición de la respuesta inmune antiviral innata, suprimiendo la respuesta de los receptores TLR y/o la activación de IFN- $\beta$ , e incluso inhibiendo las señales a través de proteínas mitocondriales<sup>18</sup>.

HBx no se empaqueta en los nuevos viriones, se detecta en el núcleo de los hepatocitos infectados y se une al ADNccc, para permitir el control epigenético de la transcripción del ADN viral<sup>19,20</sup>. La multifuncionalidad del HBx tanto sobre la célula hepática como sobre la replicación viral evidencia su papel como principal responsable de la persistencia de la infección y sus consecuencias clínicas, que la convierten en "el elemento a bloquear" en una hipotética terapia curativa de la infección por VHB. De hecho, los cambios de nucleótidos en el gen X pueden tener consecuencias importantes en la infección del VHB (Ej: T1485, C1479, A1613, T1653, T1689, A1753, T1766, A1768, A1776)<sup>21-24</sup>, algunas de ellas relacionadas con el genotipo viral<sup>25</sup>. Estos cambios, solos o en combinación, pueden cambiar la función reguladora del promotor basal del core (PBC), disminuyendo la expresión de HBsAg y facilitando su seroconversión<sup>26</sup>. Algunas variantes, particularmente la mutación doble T1762/A1764 se asocia a cirrosis y HCC<sup>27,28</sup>. Algunas variantes afectan directamente la secuencia de aminoácidos (aa) (I130M, V131L y F132FY) que se asocian con las principales variantes en PBC. Las mutaciones en los aa 5, 130 y 131 pueden contribuir al desarrollo de HCC y podrían ser útiles como valor pronóstico clínico en pacientes con HCC<sup>29</sup>. Además, destacan las variantes con deleciones localizadas entre las cajas TATA2 y 3 del PBC (región solapada con el gen X). El estudio de esta región tan relevante y sus consecuencias clínicas ha sido objeto de dos proyectos anteriores de nuestro grupo ya concluidos (**PI06/1652 y PI08/0899**) cuyos resultados ya han sido reportados<sup>30-32</sup>. En uno de estos proyectos (**PI09/0899**) se observó que las variantes más comunes de este tipo son deleciones de 8 nucleótidos que dan lugar a un desplazamiento del marco de lectura creando un nuevo codón stop en la posición 134, dando lugar a un antígeno HBx truncado en su extremo COOH terminal<sup>31</sup>, alterando su efecto proapoptótico<sup>33</sup> o

transactivador que estimula la replicación viral<sup>22</sup>. Estas variantes son muy frecuentes en ADN integrado de tejido tumoral y se han asociado al desarrollo de hepatocarcinoma como por ejemplo, la pérdida del efecto proapoptótico<sup>33</sup>. En este sentido es esencial conocer la complejidad de la región X completa (incluida su promotor específico) para sugerir una diana potencialmente útil para su bloqueo mediante terapia génica dirigida.

Estudios previos sobre la variabilidad de esta región<sup>34</sup> se basan en técnicas que sólo permiten conocer las variantes mayoritarias y, además, pueden dar lugar a resultados falsamente negativos, por el diseño de los cebadores en regiones con deleciones o ricas en polimorfismos que las técnicas habituales (secuenciación directa o clonaje de baja cobertura) no permiten detectar. Sin embargo, la secuenciación masiva (ultra-deep pyrosequencing, UDPS) permite obtener lecturas más largas (hasta 750 bases) facilitando el descubrimiento de variantes asociadas en una sola lectura, y gracias a los algoritmos desarrollados como resultado del proyecto **PI12/1893** en curso, las variantes de alta complejidad (deleciones en inserciones incluso en zonas homopoliméricas) pueden ser detectadas con una gran sensibilidad (>0.25%)<sup>17</sup> (manuscritos en preparación). Actualmente, sólo existe un estudio<sup>35</sup> que analiza el HBx por UDPS, y observan que la integración recurrente en el promotor del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TITH) se correlaciona con el aumento de la expresión TITH. La región del virus que participa en la integración y alteración estructural viral está en el extremo 3' de la proteína HBx, que es la que resulta truncada frecuentemente como resultado de las mutaciones por deleción. Un estudio de nuestro grupo centrado en la región preCore pero incluyendo los 8 codones del extremo C' del gen X (1814-1838) (proyecto **PI 09/0899**), ha observado inserciones y deleciones en la secuencia que comportan el cambio en la funcionalidad del HBx<sup>31</sup>. De hecho, el proyecto en curso (**PI12/1893**), ha permitido una gran optimización de los procedimientos de secuenciación y los algoritmos computacionales que han permitido validar incluso inserciones y deleciones en zonas homopoliméricas. Actualmente disponemos de la experiencia y la metodología necesaria para proponer como objetivo central del presente proyecto un estudio completo de la complejidad de la quasispecies del VHB en la región X y su promotor correspondiente y detectar regiones hiperconservadas que puedan sugerirse como dianas terapéuticas para terapia génica dirigida. Los resultados disponibles del proyecto **PI12/1893** parecen descartar la región 3' codificante del gen X como posible candidata a diana terapéutica, por lo que deben explorarse la región 5' terminal del gen X y su promotor específico.

#### **Grupos nacionales e internacionales que trabajan en líneas afines al proyecto**

En el ámbito español Dr. J. García-Samaniego (Madrid), Dr A Avellón y Dr JE Echevarría (Madrid). En el ámbito internacional, destacan trabajos por el grupo de la Dra. Pollicino (Messina, Italia); Dr. Levrero (Roma, Italia) y Dra Protzer (Munic, Alemania) Dra Dandri (Hamburg, Alemania).

Expediente N°  
PI 15/0856

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr Francisco Rodriguez-Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
SECCIÓN ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Citar las referencias incluidas en el apartado anterior: Antecedentes y Estado actual.

Máximo 1 página

1. WHO Hepatitis B.
2. Chevaliez, S. Is HBsAg quantification ready, for prime time? *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 37, 559 -563 (2013).
3. Locarnini, S. & Zoulim, F. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir. Ther.* 15, 3 -14 (2010).
4. Devi, U. & Locarnini, S. Hepatitis B antivirals and resistance. *Curr. Opin. Virol.* 3, 495 -500 (2013).
5. Yildiz, U. H. et al. Recent advances in micro/nanotechnologies for global control of hepatitis B infection. *Biotechnol. Adv.* (2014). doi:10.1016/j.biotechadv.2014.11.003
6. Kwon, H. & Lok, A. S. Hepatitis B therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 275 -84 (2011).
7. Krastev, Z.-A. The `return' of hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* 12, 7081 -6 (2006).
8. Zoulim, F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J. Hepatol.* 42, 302 -8 (2005).
9. Chang, J., Guo, F., Zhao, X. & Guo, J.-T. Therapeutic strategies for a functional cure of chronic hepatitis B virus infection. *Acta Pharm. Sin. B* 4, 1 -10 (2014).
10. Xu, Y. et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol. Immunol.* 46, 2640 -2646 (2009).
11. Klein, C. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 125, 9 -18 (2003).
12. McCaffrey, A. P. et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 21, 639 -44 (2003).
13. Shlomai, A. & Shaul, Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 37, 764 -70 (2003).
14. Ain, Q. U., Chung, J. Y. & Kim, Y. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J. Control. Release* (2015). doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.036
15. Yuen, M. et al. Phase II, dose ranging study of ARC-520, a siRNA-based therapeutic, in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 60, 34 (2014).
16. Gregori, J. et al. Inference with viral quasispecies diversity indices: clonal and NGS approaches. *Bioinformatics* (2014). doi:10.1093/bioinformatics/btt768
17. Homs, M. et al. Clinical application of estimating hepatitis B virus quasispecies complexity by massive sequencing: correlation between natural evolution and on-treatment evolution. *PLoS One* 9, e112306 (2014).
18. Feitelson, M. a, Bonamassa, B. & Arzumanyan, A. The roles of hepatitis B virus-encoded X protein in virus replication and the pathogenesis of chronic liver disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 18, 293 -306 (2014).
19. Belloni, L. et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19975 -9 (2009).
20. Lucifora, J. et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* 55, 996 -1003 (2011).
21. Asim, M. et al. Hepatitis B virus BCP, Precore/core, X gene mutations/genotypes and the risk of hepatocellular carcinoma in India. *J. Med. Virol.* 82, 1115 -25 (2010).
22. Zhu, Y. et al. Comparison study on the complete sequence of hepatitis B virus identifies new mutations in core gene associated with hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 2623 -30 (2010).
23. Cho, H. C. et al. The Seroconversion Rate of Hepatitis A Virus Vaccination among Patients with Hepatitis B Virus-Related Chronic Liver Disease in Korea. *Gut Liver* 5, 217 -20 (2011).
24. Kim, S., Wang, H. & Ryu, W.-S. Incorporation of eukaryotic translation initiation factor eIF4E into viral nucleocapsids via interaction with hepatitis B virus polymerase. *J. Virol.* 84, 52 -8 (2010).
25. Yan, C.-H. et al. Hepatitis B virus basal core promoter mutations A1762T/G1764A are associated with genotype C and a low serum HBsAg level in chronically-infected HBeAg-positive Chinese patients. *Antiviral Res.* 96, 108 -14 (2012).
26. Okamoto, H. et al. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J. Virol.* 64, 1298 -303 (1990).
27. Kitab, B. et al. Variability in the precore and core promoter regions of HBV strains in Morocco: characterization and impact on liver disease progression. *PLoS One* 7, e42891 (2012).
28. Jang, J. W. et al. Mutational complex genotype of the hepatitis B virus X/precore regions as a novel predictive marker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 103, 296 -304 (2012).
29. Lee, J.-H., Han, K.-H., Lee, J. M., Park, J. H. & Kim, H.-S. Impact of hepatitis B virus (HBV) x gene mutations on hepatocellular carcinoma development in chronic HBV infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 914 -21 (2011).
30. Homs, M. et al. Quasispecies dynamics in main core epitopes of hepatitis B virus by ultra-deep-pyrosequencing. *World J. Gastroenterol.* 18, 6096 -105 (2012).
31. Homs, M. et al. Ultra-deep pyrosequencing analysis of the hepatitis B virus preCore region and main catalytic motif of the viral polymerase in the same viral genome. *Nucleic Acids Res.* 39, 8457 -71 (2011).
32. Ramírez, C. et al. A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model. *Antiviral Res.* 98, 273 -83 (2013).
33. Kew, M. C. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 Suppl 1, 144 -152 (2011).
34. Datta, S. et al. Analysis of hepatitis B virus X gene phylogeny, genetic variability and its impact on pathogenesis: Implications in Eastern Indian HBV carriers. *Virology* 382, 190 -198 (2008).
35. Toh, S. T. et al. Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alteration

Expediente Nº  
PI 15/0856

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr Francisco Rodriguez-Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
SECCIÓN HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

(Ajustese al espacio disponible)

**HIPÓTESIS**

Dado el papel esencial de la proteína X del VHB (HBx) en la regulación del ciclo del VHB, la complejidad de esta región puede estar asociada con la progresión de la enfermedad. La hipótesis central de este proyecto es que el bloqueo de las regiones del genoma del VHB que codifican o regulan la expresión del gen X (e.g. su promotor específico) podría inhibir la replicación viral de manera duradera e incluso erradicar el ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), principal responsable de la persistencia de esta infección. Para el diseño de una posible terapia de bloqueo genómico es necesario detectar zonas altamente conservadas en dicha región que evidenciarían su papel esencial. Estas regiones conservadas deben demostrarse en cualquier estadio de la infección, durante la evolución natural de la misma e incluso bajo el efecto de tratamiento antiviral.

**OBJETIVOS**

1. Estudiar las diferentes poblaciones virales con mutaciones por sustituciones, inserciones o deleciones, en las regiones promotora y codificante de la proteína HBx del VHB, para establecer el posible valor pronóstico de dichas mutaciones como marcador de severidad de la enfermedad hepática. El desarrollo de este objetivo se verá facilitado por la optimización de los algoritmos de análisis bioinformático desarrollados en el proyecto de acción estratégica en salud PI12/1893, actualmente en curso, que permiten la detección y cuantificación de cambios con inserciones o deleciones incluso en regiones de alta dificultad (ej. regiones homopoliméricas).
2. Estudio de la complejidad de las poblaciones virales (quasiespecies) del VHB, mediante diferentes estimadores (Entropía de Shannon, índice de Gini-Simpson, frecuencia de mutación, diversidad nucleotídica, etc.) para valorar la efectividad de cada uno de ellos como valor pronóstico de los diferentes grados de severidad de la infección.
3. Buscar zonas hiperconservadas en el gen X y su promotor, potencialmente útiles como dianas para su bloqueo mediante terapia génica dirigida. Para valorar el posible papel de motivos conservados, se estudiará el efecto de la alteración del gen X (mediante mutagénesis dirigida y transfección en un modelo de cultivo "in vitro") sobre la replicación del VHB.

Expediente N°  
PI 15/0856

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr Francisco Rodríguez-Frías

**MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
SECCIÓN PROYECTOS COORDINADOS**

En caso de Proyectos Coordinados, el COORDINADOR deberá indicar:

- Objetivos globales del proyecto coordinado, la necesidad de dicha coordinación y el valor añadido que se espera obtener de la misma.
- Objetivos específicos de cada subproyecto (deben estar recogidos además en la memoria de cada subproyecto)
- Interacción entre los distintos objetivos, actividades y subproyectos.
- Los mecanismos de coordinación previstos para la eficaz ejecución del proyecto. **Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)**

Expediente N°  
PI 15/0856

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr Francisco Rodriguez-Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
SECCIÓN METODOLOGÍA

Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio.

Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)

**DISEÑO**

En este proyecto se incorporarán un total de 90 pacientes con infección crónica por VHB, en diferentes estadios de la infección (ver detalles en apartado de sujetos de estudio) y que firmen consentimiento informado en el momento de su inclusión para que autorizen la utilización de todas sus muestras que están disponibles en nuestra seroteca. Estos pacientes se seleccionarán entre la población que acude a las consultas externas del Hospital Universitario Vall d'Hebron, donde anualmente son atendidos aproximadamente 600 pacientes con hepatitis crónica B. De los pacientes seleccionados se recopilarán retrospectivamente datos demográficos y clínicos para establecer de forma objetiva la evolución de su infección crónica por VHB y la enfermedad hepática asociada, desde el momento de acudir a las consultas externas de nuestro centro por primera vez hasta la actualidad. Se considerarán candidatos para incluirse en este proyecto los pacientes que no presenten coinfecciones con virus de la hepatitis C (VHC), D (VHD) e inmunodeficiencia humana (VIH) y sin inmunosupresión. Además, solo se tendrán en cuenta los pacientes con un período mínimo de seguimiento en nuestro centro de 5 años, durante el cual se disponga de muestras de suero o plasma con niveles de ADN del VHB suficientes para su amplificación por PCR, y de los que se disponga de una biopsia realizada en un período de 2 años antes o después de la fecha de extracción de la muestra de suero o plasma, y/o pruebas de imagen y elastografía que confirmen el estadio de su enfermedad.

A los pacientes que cumplan los anteriores criterios se les facilitará una hoja de consentimiento informado. Si aceptan participar en el estudio, se buscará de forma retrospectiva una muestra de suero o plasma y una biopsia conservada en parafina, ambas obtenidas en el momento de su primer diagnóstico y entre 4-5 años posterior a dicho diagnóstico (muestra con ADN VHB detectable). En todas estas muestras se analizará por secuenciación masiva la quasiespecies del VHB en el promotor del gen X y en su región codificante.

Los datos obtenidos por secuenciación masiva serán analizados para identificar los cambios de aminoácido, inserciones y/o deleciones más frecuentes del gen X y su promotor, así como las zonas más conservadas de estas regiones en cada uno de los grupos de pacientes. Los resultados obtenidos, tanto a nivel de quasiespecies circulante como hepática, se correlacionarán con los datos clínicos y demográficos obtenidos al principio del proyecto para determinar la relación de las inserciones, deleciones y cambios de aminoácido con el estado de la infección crónica del VHB, gravedad de la enfermedad hepática y respuesta al tratamiento antiviral.

La fase final del proyecto consistirá en evaluar el potencial de estas zonas conservadas como diana terapéutica contra el VHB "in vitro", mediante experimentos de mutagénesis dirigida contra estas zonas y transfección transitoria de las construcciones genéticas obtenidas a un sistema de cultivo celular capaz de sostener la replicación de VHB.

**SUJETOS DE ESTUDIO**

**Grupo A: 30 pacientes portadores inactivos del VHB**

Se considerarán portadores inactivos del VHB los pacientes HBeAg - y anti-HBe + con niveles de ADN-VHB por debajo de 20.000 UI/mL y niveles de alanin aminotransferasa (ALT) normales durante todo el período estudiado. Se analizarán dos muestras por paciente.

**Grupo B: 40 pacientes con hepatitis crónica**

Pacientes con hepatitis crónica i replicación viral activa. Se incluirán muestras de pacientes en periodo anterior a tratamiento antiviral, así como muestras de pacientes tratados y que no presentan respuesta virológica. Se analizarán dos muestras por paciente y estos se clasificarán en dos subgrupos:

Subgrupo B1: 15 pacientes con HBeAg +

Subgrupo B2: 25 pacientes con HBeAg -

**Grupo C: 20 pacientes con cirrosis**



Se seleccionarán aquellos pacientes que tengan un diagnóstico de cirrosis (compensada y descompensada) confirmado por biopsia hepática y/o técnicas de imagen o elastografía. Se analizará dos muestras separadas por un periodo mínimo de 5 años (priorizando aquellas muestras en el que el estadio de fibrosis sea diferente)

#### VARIABLES A ANALIZAR:

1. Se recogerán retrospectivamente datos demográficos, serología de VHB, VHC, VHD y VIH niveles de ADN del VHB, de ALT y de daño hepático a través de los resultados de biopsias y pruebas no invasivas de imagen y/o elastografía de los pacientes con hepatitis crónica B atendidos en las consultas externas de nuestro centro. Con estos datos se determinará la inclusión o no de los pacientes en el estudio y se clasificarán en el grupo y subgrupo adecuados.

2. Se analizarán diferentes parámetros de la quasispecies del VHB por secuenciación masiva en las siguientes regiones:

i. La región codificante del gen X del VHB, entre los nucleótidos 1374 y 1838 de su genoma.

ii. La región promotora del gen X del VHB, entre los nucleótidos 1255 y 1390 de su genoma.

En ambas regiones se determinará el genotipo del VHB mediante filogénesis de la región del preS y del dominio de la retrotranscriptasa. En relación a la secuencia consenso del genotipo asignado, se determinará la frecuencia de las variantes con cambios de aminoácido, inserciones y/o deleciones. También se analizará el grado de conservación entre diferentes muestras de diferentes zonas de la región analizada. Finalmente se analizará la complejidad de la quasispecies del VHB (variabilidad de la mezcla de poblaciones virales que la componen), mediante el cálculo de la entropía de Shannon, índice de Gini-Simpson, diversidad nucleotídica y frecuencia de mutación. Todos estos parámetros se correlacionarán con los datos obtenidos del análisis retrospectivo de la historia clínica de estos pacientes para determinar su relación con el estado de la infección crónica por VHB y su enfermedad hepática asociada. Para asegurar la validez de los cambios observados en los valores de estos índices, también se analizará la variabilidad de los parámetros de la quasispecies del VHB mediante su coeficiente de variación intra- e inter- experimento.

3. En el estudio *“in vitro”* de la esencialidad para la replicación del VHB de las zonas más conservadas de las regiones codificante y promotora del gen X, se evaluará la producción de ADN-VHB y antígenos virales (HBsAg, HBeAg, HBcAg y HBxAg) en un sistema de cultivo celular, donde se transfectarán de manera transitoria plásmidos con alteraciones en estas regiones hiperconservadas.

#### RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS:

Los datos de tipo demográfico, bioquímico, serológico y virológico necesarios para la caracterización de la situación clínica de cada paciente (estado de la infección por VHB y gravedad de la enfermedad hepática), se recogerán mediante revisión de la historia clínica de los pacientes con hepatitis crónica B que acuden a las consultas externas del hospital universitario Vall d'Hebrón. Todos estos datos, de los pacientes que den su consentimiento para participar en este estudio, serán incluidos en una base de datos anonimizada, a partir de la cual se correlacionarán con los datos obtenidos por secuenciación masiva.

Las muestras de suero o plasma de los pacientes incluidos en el estudio se recuperarán de la seroteca de nuestro grupo. Las biopsias (obtenidas 2 años antes o después cada muestra de suero o plasma analizada) se recuperarán de la colección de biopsias conservadas en bloques de parafina en el servicio de anatomía patológica del hospital universitario Vall d'Hebrón. De estas muestras se extraerá el ADN del VHB y se analizarán las diferentes secuencias de nucleótidos y aminoácidos en la región del gen X detectables por secuenciación masiva. Los datos obtenidos mediante esta tecnología serán analizados mediante los algoritmos de análisis bioinformático desarrollados en el proyecto de acción estratégica en salud PI12/1893, actualmente en curso, adaptados para este proyecto. Estos algoritmos permitirán identificar cambios de aminoácido, inserciones y/o deleciones en el gen X y su promotor, así como las zonas más conservadas de estas regiones. Estos algoritmos ya han sido adaptados para analizar distintas regiones del genoma del VHB, como el bucle antigénico de las proteínas de superficie y la retrotranscriptasa de la polimerasa viral, en el marco del proyecto de investigación en salud PI11/01973 (Rodríguez-Frías F, et al. PLoS ONE 2012;7:e37874, Buti M et al. Transpl Infect Dis, 2015; doi: 10.1111/tid.12360) o la región preCore/Core, en el

proyecto PS09/00899 (Homs M et al. Nucleic Acids Res 2011; 39:8457, Homs M et al. World J Gastroenterol 2012;18:6096, Ramirez C et al. Antiviral Res 2013;98:273). En el actual proyecto PI12/1893, gracias a estos algoritmos se han observado variantes con inserciones y/o deleciones en el extremo 5' de la región codificante del gen X en una proporción superior al 20% de más de tres millones de secuencias (resultados en fase de escritura para su publicación).

Una vez analizados los datos obtenidos por secuenciación masiva, se simularán alteraciones de la secuencia en las regiones con un mayor grado de conservación por mutagénesis dirigida en plásmidos con el genoma completo del VHB insertado. Estas construcciones se transfectarán a un sistema de cultivo celular, donde se analizarán los títulos de ADN (mediante PCR a tiempo real cuantitativa) y antígenos del VHB (HBsAg, HBeAg, HBcAg y HBxAg, mediante inmunoensayos) en los sobrenadantes de los cultivos, para evaluar los niveles de replicación y expresión de proteínas virales.

#### **LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONSIDERACIONES FINALES:**

La principal limitación de este estudio es la alta complejidad técnica y el elevado coste económico de la secuenciación masiva que limita el tamaño de la muestra de pacientes. No obstante, el número de pacientes que se pretende incluir así como el número de muestras a procesar permiten augurar el cumplimiento de los objetivos propuestos. Para garantizar una sensibilidad <0.1% y asumir que la región es altamente conservada, el principal objetivo de este estudio, se requieren de un número muy elevado de secuencias por muestra (>30.000). Así mismo el diseño del estudio requiere de la secuenciación masiva de 2 fragmentos diferentes por muestra y 2 muestras por paciente, lo que representa el estudio de unas 360 quasispecies virales y un mínimo de 6.000.000 de secuencias validadas. El desarrollo tecnológico actual permite prever la disponibilidad de plataformas de secuenciación masiva de tercera generación capaces de analizar las dos regiones propuestas en un único fragmento. De ser así el proyecto propuesto podrá ampliarse de forma significativa durante el desarrollo del mismo. No obstante con las condiciones y experiencias actuales se puede garantizar el estudio de estas 360 quasispecies. Por este motivo, a pesar de las limitaciones en cuanto al número de muestras que se pueden incluir en el estudio, el alto rendimiento de la secuenciación masiva demostrado en anteriores proyectos (PI09/0899, PI11/01973, PI12/01893) y las metodologías experimentales y algoritmos bioinformáticos desarrollados en los mismos permitirá analizar la variabilidad y conservación de diferentes regiones del genoma del VHB dentro de la quasispecies, con una sensibilidad muy superior a la clonación molecular, lo que justifica el uso de las tecnologías de secuenciación masiva en este proyecto. Esta tecnología representa una oportunidad excepcional para la detección de posibles dianas terapéuticas para tratamientos de bloqueo génico de esta infección reconocida como "incurable" mediante las terapias convencionales por las sociedades científicas tanto nacionales como internacionales.

Por otro lado, la comprobación "in vitro" de la esencialidad de las regiones más conservadas del gen X y su promotor también supone una elevada complejidad técnica, ya que requerirá la puesta a punto de un nuevo sistema de cultivo celular, capaz de soportar la replicación del VHB y lo más parecido posible a las condiciones fisiológicas del huésped. La obtención de construcciones con alteraciones en las regiones de interés también supone una dificultad adicional, pero una vez obtenidas son una herramienta útil y aplicable a cualquier modelo "In vitro" o "in vivo" que puedan desarrollar en la comunidad científica. Por estos motivos, la gran importancia de identificar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de terapias génicas que consigan la erradicación del VHB justifican esta parte del proyecto.

Expediente N°  
PI 15/0856

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr Francisco Rodriguez-Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
SECCIÓN PLAN DE TRABAJO

Etapas de desarrollo y distribución de las tareas de todo el equipo investigador, y las asignaciones previstas para el personal técnico que se solicita. Indicar además el lugar/centro de realización del proyecto.

(Ajustese al espacio disponible)

El estudio se realizará conjuntamente entre facultativos e investigadores de la unidad patología hepática (Servicios de bioquímica y microbiología) y facultativos de la unidad de hepatología (Servicio de Medicina Interna) del hospital universitario Vall d'Hebron. Los miembros que formarán parte del equipo son el doctor Francisco Rodriguez-Frías (FRF) y Leonardo Nieto (LN), responsables y facultativo de la unidad de patología hepática, respectivamente; Andrea Caballero (AC) facultativo responsable del área de preanalítica de los laboratorios de bioquímica del hospital Vall d'Hebron y la doctora Pilar Reimundo (PR), residentes de Bioquímica del hospital. Los doctores Lluís Castells (LC) y Mar Riveiro (MR) del servicio de medicina interna serán los miembros clínicos del equipo clínico. Los miembros de investigación de la unidad de patología hepática son la doctora Maria Homs (MH) y Rosario Casillas (RC). En el estudio también colaborarán de forma ocasional los técnicos asistenciales de laboratorios clínicos (Montserrat Saez [MS] y Gerardo Ruiz [GR], y el Dr. Josep Gregori (JG) como soporte bioinformático.

En este proyecto se han diferenciado 6 etapas:

- (1) Selección de pacientes con hepatitis crónica por VHB HBeAg + (grupo A) y pacientes con infección por VHB, en estado de hepatitis crónica o de portador inactivo (grupo B). Selección los pacientes de forma prospectiva, a medida que firmen el consentimiento informado (LC y MR). Lugar de realización consultas externas Hospital Vall d'Hebron.
- (2) Selección de las muestras a procesar, realización de determinaciones bioquímicas para caracterizar los pacientes y posterior almacenaje de las muestras de sangre total y suero a -20°C (MH, RC, GR y MS).
- (3) Elaboración de una base de datos anonimizada para incluir los parámetros demográficos (edad, sexo, tiempo conocido de infección, etc), resultados de las pruebas de elastografía, y determinaciones serológicas (HBsAg cualitativo y cuantitativo, HBeAg y anti-HBe), virológicas (ADN del VHB) y bioquímicas (alanino aminotransferasa [ALT], aspartato aminotransferasa [AST], plaquetas). Esta etapa se llevará a cabo desde el inicio y durante todo el proyecto y colaborará todo el personal del equipo de investigación.
- (4) En paralelo a la inclusión de los pacientes, el personal de investigación (MH y RC) realizarán las técnicas de biología molecular para amplificar la región del genoma del VHB de interés para el estudio (PCR gen x del VHB).
- (5) Se realizará secuenciación directa (Sanger) de la región de la retrotranscriptasa y del preS del genoma para definir el genotipo del VHB por filogénesis. Se realizarán estas tareas a medida que se incluyan los pacientes.
- (6) Los productos de PCR de la región del gen x serán analizados por secuenciación masiva (UDPS) en las plataformas GS-FLX y GS-Junior (454/Roche), disponibles en la unidad de patología hepática. Esta tarea empezará a partir del segundo trimestre del primer año y durará hasta el final del proyecto, ya que se analizarán mediante la misma técnica las muestras recogidas durante el seguimiento prospectivo de los pacientes de los grupos A y B.
- (7) Análisis bioinformático y estadístico de los resultados se realizará con la colaboración de JG. El tiempo requerido para el análisis bioinformático se estima entre 6 y 12 meses, dependiendo de la calidad y del número de secuencias obtenidas. Los resultados con interés virológico y para la aplicación clínica serán analizados y estudiados con detalle por FRF, EC, LN, LC, MH y MR a medida que se vayan obteniendo, entre el segundo semestre del segundo año y el final del proyecto.
- (8) Elaboración de manuscritos para la publicación de los resultados obtenidos en revistas clínicas y/o virológicas de alto impacto, implicando a todo el equipo investigador, durante el último año del proyecto.