

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 356 458**

21 Número de solicitud: 200901846

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G06F 19/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **11.09.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.04.2011

62 Número de la solicitud inicial: **P 200502423**

71 Solicitante/s: **PROGENIKA BIOPHARMA, S.A.**
Parque Tecnológico de Zamudio
Ibaizabal Bidea, Edif. 801-A 2ª Planta
48160 Derio, Vizcaya, ES

72 Inventor/es: **Tejedor Hernández, Diego;**
Martínez Martínez, Antonio y
Simón Buela, Laureano

74 Agente: **González Díaz, Vicente**

54 Título: **Métodos y productos para genotipado *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos.**

57 Resumen:

Métodos y productos para genotipado *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos.

El método de genotipado se basa en la combinación de un diseño experimental de DNA-chips de genotipado y en el desarrollo de un sistema secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por dichos DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación, que permiten que dichos DNA-chips puedan ser utilizados como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico; en particular, en la detección de variaciones génicas, por ejemplo, polimorfismos o mutaciones génicas asociadas con la resistencia a tratamientos farmacológicos.

ES 2 356 458 A1

DESCRIPCIÓN

Métodos y productos para genotipado *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos.

5 **Campo de la invención**

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico *in vitro*, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante DNA-chips, para la detección de variaciones génicas, por ejemplo, polimorfismos o mutaciones génicas asociadas con la resistencia a tratamientos farmacológicos.

10 **Antecedentes de la invención**

15 *DNA-chips*

En el año 2001, el Consorcio para el Proyecto Genoma Humano y la empresa privada Celera presentaron un primer borrador completo del genoma humano con 30.000 genes. A partir de este momento se iniciaba la posibilidad del estudio del genoma completo o estudios a gran escala (high-throughput). Los denominados "DNA-chips", también denominados "microarrays", "DNAarrays" o "bio-chips de DNA" son herramientas que la Genómica Funcional puede usar para los estudios a gran escala que se plantean en la actualidad. La Genómica Funcional estudia los cambios en la expresión de los genes debidos al ambiente al que está sometido el individuo y a las características genéticas del mismo. La secuencias de los genes presentan pequeñas variaciones interindividuales de un único nucleótido que reciben el nombre de SNP ("single nucleotide polymorphism") que en un pequeño tanto por ciento están implicados en cambios en la expresión de los genes que causan determinadas patologías. La mayoría de los estudios que aplican DNA-chips son de expresión génica aunque también se utilizan en la detección de SNPs.

El primer DNA-chip fue el "Southern blot" en el que moléculas de ácidos nucleicos marcadas se utilizaban para interrogar moléculas de ácidos nucleicos unidas a un soporte sólido. El soporte sobre el que se llevaba a cabo la interrogación en los primeros DNA-chips eran membranas de nylon. Aunque se partía de una buena idea, la técnica era todavía muy laboriosa.

Dos avances marcaron el arranque definitivo de los DNA-chips. Por una parte, el uso de un soporte sólido no poroso, como el vidrio, que facilitó la miniaturización y la detección basada en fluorescencia. Por otra parte, la adaptación de técnicas fotolitográficas utilizadas en la elaboración de semiconductores para la producción de DNA-chips conteniendo cada uno de ellos más de 400.000 oligonucleótidos distintos, en una región de aproximadamente 20 μm^2 , los denominados DNA-chips de alta densidad.

Concretamente un DNA-chip es un soporte sólido que contiene cientos de fragmentos de secuencias de genes diferentes representadas en forma de DNA, cDNA u oligonucleótidos inmovilizadas o unidas en su superficie en posiciones fijas. Los soportes son generalmente portaobjetos de vidrio para microscopio, membranas de nylon o "chips" de silicio. Es importante que estas secuencias o sondas estén unidas al soporte en un orden fijo ya que la localización robotizada de cada uno de ellos determina el gen cuya expresión se está midiendo. En función de la tecnología empleada para la producción de los DNA-chips se pueden clasificar en:

45 - DNA-chips de alta densidad: Los oligonucleótidos que se encuentran en la superficie del portaobjetos de vidrio han sido sintetizados "*in situ*", mediante una metodología denominada fotolitografía.

50 - DNA-chips de baja densidad: En este caso los oligonucleótidos, cDNA o fragmentos de PCR son depositados en forma de nanogotas en la superficie del cristal mediante un robot que imprime esas secuencias de DNA en el portaobjetos. Existen pocos ejemplos de DNA-chips de baja densidad y, al contrario que en los de alta densidad, son pocas las variaciones génicas detectadas: un DNA-chip para la detección de 5 mutaciones puntuales en el gen de la tirosinasa, un DNA-chip para la detección de mutaciones en p53 y k-ras, un DNA-chip para la detección de 12 mutaciones causantes de cardiomiopatía hipertrófica, un DNA-chip para el genotipado de cepas de *Escherichia coli* o DNA-chips para la detección de patógenos tales como *Cryptosporidium parvum* o rotavirus.

Según la estrategia de diseño de los oligonucleótidos se puede hablar de:

60 - "Standard tiling": Se diseñan 4 oligonucleótidos totalmente complementarios a la secuencia de referencia excepto en la posición central donde se interrogan las 4 posibilidades: A, C, G y T; un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para el genotipado de HIV-1 (Affymetrix). La posición central asegura máxima especificidad.

65 - "Alternative tiling": En este caso son 5 los oligonucleótidos diseñados, de forma que el quinto interroga una posible delección en la secuencia; un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para la detección de mutaciones en p53 (Affymetrix).

- "Block tiling": Se diseñan 4 oligonucleótidos totalmente complementarios a la secuencia normal y otros 4 totalmente complementarios a la secuencia mutante; el nucleótido que cambia se coloca en la posición central, pero 2

ES 2 356 458 A1

nucleótidos antes o después se coloca un “mismatch” que puede ser una de las cuatro bases (A, C, T o G); un ejemplo ilustrativo de esta estrategia es el DNA-chip para la detección de mutaciones en el citocromo p450 (Affymetrix). Dentro de esta última estrategia [“block tiling”] Affymetrix usa el “mismatch” para aumentar la especificidad de la hibridación no sólo en una posición sino en las posiciones -4, -1, 0, +1 y +4 para identificar el cambio producido en la posición central ó 0. Esta estrategia se denomina “Alternative block tiling” y un claro ejemplo es el DNA-chip para la detección de 1.500 SNPs (Affymetrix).

En el caso de estudios de expresión génica, las sondas depositadas en el vidrio se hibridan con los cDNAs sintetizados a partir de los mRNAs extraídos del tejido que se quiere analizar. Estas moléculas de cDNA han sido marcadas con un fluoróforo al sintetizarse; cuanto mayor sea el número de moléculas que se unen a su secuencia complementaria en el DNA-chip, mayor será la cantidad de fluoróforo que se detecta y mide tras excitarlo con un láser. Esta medida es, por tanto, reflejo del número de moléculas de cada mRNA que había en el tejido analizado y, consecuentemente, reflejo del nivel de expresión de cada gen representado en el DNA-chip, lo que se denomina un patrón de expresión de la célula. Estos DNA-chips de expresión contienen también sondas que representan genes de control (“house-keeping genes”), lo que permite normalizar los resultados y comparar múltiples experimentos de forma cuantitativa. Con un DNA-chip, se pueden determinar en un solo experimento los niveles de expresión de cientos o miles de genes de una célula. El cDNA de la muestra problema y de la muestra control se pueden marcar con dos fluoróforos distintos por lo que en el mismo DNA-chip se pueden estudiar las diferencias entre la expresión de los genes en la muestra control y en la muestra problema.

Los DNA-chips para la detección de polimorfismos genéticos, cambios o mutaciones en general, variaciones génicas, en la secuencia de DNA, comprenden unas superficies sólidas, típicamente de cristal, en las que está depositado un elevado número de secuencias génicas complementarias de cada una de las variaciones génicas que se desea estudiar. Una de las estrategias utilizadas para detectar variaciones génicas consiste en la hibridación de las secuencias que reconocen específicamente al alelo normal y al mutado con fragmentos de DNA procedentes de la muestra que se va a analizar, amplificados mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y marcados con una molécula fluorescente. Al iluminar el DNA-chip con el láser se identifican aquellas secuencias que se han unido a la muestra problema y así se discrimina específicamente un paciente normal de un heterocigoto o un homocigoto mutante. Otra estrategia básica de detección de variaciones génicas con DNA-chips de genotipado consiste en llevar a cabo una reacción de amplificación o extensión sobre el propio DNA-chip.

Dentro de la estrategia de hibridación se puede hacer una subclasificación en función del método de análisis de la información para el genotipado:

- Aumento de la señal de hibridación: Esta estrategia compara la señal de hibridación de las sondas complementarias a los alelos normales y a los alelos mutantes. En general, las muestras mutadas deben presentar una mayor señal de hibridación en las sondas complementarias a los alelos mutantes que en el caso de los individuos normales.

- Pérdida de la señal de hibridación: Los cambios en la secuencia entre una muestra control y una muestra a estudio se pueden identificar por una caída en la señal de hibridación de los oligonucleótidos totalmente complementarios con la secuencia de referencia. En los individuos homocigotos se produce una pérdida completa de señal mientras que en los heterocigotos se produce una pérdida del 50% de la señal. En los DNA-chips para interrogar todas las bases de una secuencia de “n” nucleótidos (“oligonucleótido”) de longitud en ambas hebras es necesario un mínimo de “2n” oligonucleótidos que solapan con el oligonucleótido anterior en toda la secuencia salvo en un nucleótido. Este diseño de los oligonucleótidos recuerda a los orígenes de los DNA-chips en membranas de nylon pero, en este caso, el tamaño de los oligonucleótidos es de 25 nucleótidos y no de 8 nucleótidos. El elevado número de oligonucleótidos empleados para reconstruir la secuencia hace que los errores derivados de la fluctuación en la señal de hibridación que se producen en la estrategia de ganancia de señal se minimicen. Por el contrario, el cambio exacto en la secuencia no se puede identificar con esta metodología; es necesario secuenciar posteriormente para conocer la mutación.

La segunda estrategia para la detección de variaciones génicas mediante el empleo de DNA-chips de genotipado, consistente en la amplificación o extensión sobre el propio DNA-chip, se aborda con tres aproximaciones:

- “Minisequencing”: Un cebador específico de la mutación es inmovilizado en el portaobjetos y, después de una reacción de extensión con didesoxinucleótidos fluorescentes, se captura la imagen del DNA-chip con un escáner.

- “Primer extensión”: Se inmovilizan dos oligonucleótidos por mutación y la reacción de extensión se lleva a cabo con un nucleótido fluorescente y los demás naturales siendo el material de partida RNA o el producto de una PCR.

- “Tag arrays”. La reacción de extensión se lleva a cabo en solución con cebadores específicos que llevan una determinada secuencia o “tag” en 5’. El uso de DNA-chips con oligonucleótidos complementarios a esas secuencias o “tags” permite la captura de los productos resultantes de la extensión. Ejemplos ilustrativos de esta aproximación incluyen el DNA-chip de alta densidad “Gene-Flex” (Affymetrix), aunque también existen DNA-chips de baja densidad.

A la hora del diseño de herramientas para el diagnóstico genético, la sencillez experimental debe ser tenida muy en cuenta. Se debe analizar, por tanto, la complejidad técnica que supone para el usuario final el análisis de DNA-chips basados en hibridación diferencial frente a los basados en la metodología de extensión. La necesidad de un mayor número de reacciones de amplificación y purificación supone una desventaja de la estrategia basada en técnicas de extensión o amplificación frente a la estrategia basada en la hibridación.

Sin embargo, en lo relativo a la especificidad y sensibilidad de los DNA-chips, la hibridación diferencial no consigue los valores tan altos asociados con la amplificación sobre el portaobjetos de vidrio. Es por ello necesario el desarrollo de algoritmos matemáticos que aumenten la especificidad y sensibilidad de la estrategia basada en el empleo de la metodología de hibridación (Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MN, Yohn CT, Tobi KP, Kashuk C, Mathews DJ, Shah N, Eichler EE, Warrington JA, Chakravarti A. *Genome Research*; 11:1913-1925 (2001). Dentro de esta tecnología y de los DNA-chips de baja densidad, la elección es sin duda el uso de oligonucleótidos diferentes para detectar al alelo normal y al mutante (“aumento de la señal de hibridación”).

La inutilidad de los DNA-chips existentes en la actualidad para detectar simultáneamente la presencia o ausencia de un número elevado de variaciones génicas, de manera sensible, específica y reproducible, ha impedido su aplicación como herramientas de uso rutinario para el diagnóstico clínico de enfermedades humanas. Los inventores han desarrollado un método secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación (algoritmo). Este método se basa en un novedoso diseño experimental, que asegura unos altos niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que los DNA-chips desarrollados en base a este método, puedan ser utilizados, por ejemplo, como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico.

Reacciones adversas a fármacos

Cualquier fármaco se desarrolla con la intención de curar, aliviar, prevenir o diagnosticar una enfermedad, pero lamentablemente puede también producir efectos adversos con un riesgo que, dependiendo de cada caso concreto, irá desde valores mínimos o casi nulos a valores muy altos. Aunque sea difícil de calcular, no se debe ignorar el riesgo de los tratamientos, y el orden de magnitud debiera ser conocido por el médico, y también por el paciente, y aceptado, entendiéndose que el beneficio esperable del fármaco o de la intervención compensan ante los posibles riesgos de éstos.

Reacción adversa es cualquier efecto perjudicial o indeseado que se presente tras la administración de la dosis usualmente empleada en el ser humano para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad. El consenso actual permite que esta definición, que fuera generada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1972, pueda entenderse de la siguiente manera: “Es todo efecto no deseado que aparece al administrar un medicamento a la dosis adecuada, para la indicación adecuada, durante el tiempo adecuado, para la profilaxis, el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad, o para la modificación de una función fisiológica”.

Los países avanzados cuentan con sistemas de farmacovigilancia encargados de centralizar la supervisión de la seguridad y eficacia de los fármacos utilizados, quienes son responsables de recoger y analizar los datos de reacciones adversas, que se sospecha hayan sido producidas por los fármacos utilizados en el mercado.

En España los primeros pasos para la creación del sistema de farmacovigilancia se dieron en la década de los años setenta, y, en 1983, España se incorporó al Programa Internacional de Farmacovigilancia de la Organización Mundial de la Salud. En 1992 se creó una base de datos informatizada denominada FEDRA (Farmacovigilancia Española de Datos de Reacciones Adversas). En este sistema colabora activamente la industria farmacéutica, quienes habitualmente cuentan con unidades específicas de fármaco-vigilancia, pero además, tal y como se establece en la Ley General de Sanidad de 1986, así como en la Ley del Medicamento de 1990, todo profesional sanitario, sea médico, farmacéutico, veterinario, o personal de enfermería, está obligado a notificar a las autoridades sanitarias las sospechas de reacciones adversas a los medicamentos de las que tengan conocimiento, así como a colaborar con el Sistema Español de Farmacovigilancia. España también colabora, en este sentido, con la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA), que empezó a estar operativa en 1995. De la información recogida en FEDRA parece ser que España está en el grupo de países con mayor tasa de notificación, con una media similar a Alemania y a Francia, aunque inferior a países como EE.UU., Irlanda, Noruega, Nueva Zelanda, Reino Unido o Suecia.

En la actualidad, en países como España, en los que crece la población de edad avanzada, y en la que cada vez se consumen más fármacos, sobre todo en ese grupo de población, con cada vez también más situaciones de automedicación, es de esperar que el problema de las reacciones adversas no sea desdeñable. El Center for Drug Evaluation and Research de la FDA (U.S. Food and Drug Administration), afirma que anualmente se producen más de dos millones de reacciones adversas en EEUU, que causan alrededor de 100.000 muertes anuales, siendo la cuarta causa de muerte por delante de las enfermedades pulmonares, diabetes, SIDA, neumonía y accidentes de tráfico. El número de pacientes que mueren en Inglaterra y Gales a causa de errores en prescripción de fármacos o debido a una reacción adversa muestra una marcada tendencia creciente y el problema es que nadie conoce exactamente la magnitud del problema. En España, cinco de cada cien ingresos en los servicios de urgencias de hospitales públicos del país se deben a reacciones adversas a medicamentos y entre el 10-20% de los pacientes hospitalizados sufren este percance médico al recibir la medicación. De los enfermos, el 1% muere a consecuencia de este hecho.

Hasta Mayo 2003 se habían recibido en el Centro de Farmacovigilancia de Cataluña unas 80.000 notificaciones de reacciones adversas a medicamentos registradas en la base de datos. De ellas, dos tercios son espontáneas y en su gran mayoría parten de atención primaria. De las reacciones notificadas la mayor parte son leves o moderadas, mientras que el 12% son graves y el 1% resultaron mortales. Las más frecuentes son cutáneas, digestivas y neurológicas, tres tipos de reacciones que representan el 50% del total. Curiosamente, la mayor parte de las decisiones de retirada de medicamentos están relacionadas con reacciones hepáticas y hematológicas. Llama la atención que este tipo de reacciones -que representan un porcentaje pequeño del total- sean las que den lugar en mayor medida a la retirada del fármaco. Los antibióticos son los fármacos que mayor número de efectos adversos producen, seguidos de antiirreumáticos y analgésicos y fármacos para prevenir la enfermedad cardiovascular. La detección de eventos adversos puede provocar no sólo la retirada, sino también la determinación del cambio de uso del fármaco, la reformulación o la introducción de nuevas orientaciones para pacientes específicos.

Un DNA-chip que permita la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos, podrá ser utilizado clínicamente para prevenir la aparición de reacciones adversas en pacientes con tratamientos farmacológicos.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un método de detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas y su empleo para el desarrollo de productos para genotipado. Dicho método se basa en la combinación de un novedoso diseño experimental de DNA-chips de genotipado y en el desarrollo de un sistema secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por dichos DNA-chips de genotipado basado en el aumento de la señal de hibridación (algoritmo), lo que garantiza unos altos niveles de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, que permiten que dichos DNA-chips puedan ser utilizados, por ejemplo, como herramientas fiables de diagnóstico genético clínico.

Método de genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se incluye la definición de algunos términos:

El término "polimorfismo" se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción igual o superior a un 1% en una población; en un caso particular, cuando dicha variación es la secuencia nucleotídica ocurre en un sólo nucleótido (A, C, T o G) se denomina SNP.

El término "mutación génica" se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico donde cada secuencia posible está presente en una proporción inferior al 1% en una población.

Los términos "variante alélica" o "alelo" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un polimorfismo que ocurre en un mismo locus en una misma población.

El término "variación génica" o "variante génica", tal y como se utiliza en la presente descripción, incluye a las mutaciones, polimorfismos y variantes alélicas. Una variación o variante génica se encuentra entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones dentro de las especies.

Por tanto, la invención proporciona un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto, en adelante método de la invención, que comprende:

- extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;
- amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;
- someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;
- poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan 4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;

ES 2 356 458 A1

- introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y
- genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles.

Opcionalmente, tras el proceso de hibridación, puede llevarse a cabo sobre el propio soporte una reacción de amplificación, por ejemplo, mediante “primer extensión”, o, alternativamente, una reacción de ligación, por ejemplo, mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos (Oligonucleotide Ligation Assay u “OLA”), cuando dicho soporte es una superficie sólida, tal como un soporte de vidrio, plástico, una membrana, etc. En caso de seguir alguna de estas alternativas, el mareaje de los productos que contienen las variaciones génicas a identificar se lleva a cabo en esta etapa y no durante la reacción de amplificación ni durante el proceso de fragmentación.

La extracción del ácido nucleico (DNA o RNA) a partir de una muestra biológica que lo contiene procedente de un sujeto, tal como un ser humano, se puede llevar a cabo por métodos convencionales utilizando, opcionalmente, productos comerciales útiles para extraer dicho ácido nucleico. Prácticamente cualquier muestra biológica que contiene ácido nucleico puede ser utilizada para la puesta en práctica de la invención; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha muestra biológica puede ser una muestra de sangre, plasma, suero, secreciones, tejido, etc.

En una realización particular, el ácido nucleico a extraer es DNA. En otra realización particular, el ácido nucleico a extraer es RNA, típicamente, RNA total; esta última alternativa puede ser utilizada en caso de que la variación génica a estudiar esté situada en la secuencia codificante de un gen; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de obtención del cDNA correspondiente. La obtención de dicho cDNA se lleva a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante retrotranscripción utilizando los cebadores apropiados el RNA y como molde para la retrotranscripción.

Las etapas posteriores del método de la invención se llevan a cabo sobre el DNA extraído o sobre el cDNA correspondiente al RNA extraído. El término DNA, tal como se utiliza de aquí en adelante incluye tanto DNA como cDNA.

Las regiones de DNA que contienen las variaciones génicas a identificar (regiones DNA diana) se someten a una reacción de amplificación para obtener unos productos de amplificación que contienen las variaciones génicas a identificar. Aunque puede utilizarse cualquier técnica o método que permita la amplificación de todas las secuencias de DNA que contienen las variaciones génicas a identificar, en una realización particular, dichas secuencias se amplifican mediante una PCR multiplex. Para la realización de una PCR multiplex se requiere el empleo de unos pares de oligonucleótidos cebadores o iniciadores capaces de amplificar dichas regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas a identificar. Prácticamente puede utilizarse cualquier par de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de dichas regiones DNA diana, preferentemente, pares de oligonucleótidos cebadores que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR. De este modo, utilizando los pares de oligonucleótidos cebadores y las condiciones apropiadas, se pueden amplificar todas las regiones DNA diana necesarias para el genotipado de las variaciones génicas a analizar en el DNA-chip con el mínimo número posible de reacciones.

Opcionalmente, si se desea, durante la reacción de amplificación, puede llevarse a cabo el mareaje de los productos de amplificación con el fin de poder detectar posteriormente la hibridación entre las sondas inmovilizadas en el soporte y los fragmentos de DNA diana que contienen las variaciones génicas a detectar. El mareaje de los productos de amplificación puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, incorporando un nucleótido marcado durante la reacción de amplificación o bien utilizando cebadores marcados. Dicho mareaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos, por ejemplo, ³³P, ¹²⁵I, etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia. Alternativamente, dicho mareaje puede ser indirecto mediante el empleo de métodos químicos, enzimáticos, etc.; a modo ilustrativo, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina conjugada con un fluorocromo (marcador), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, biotina (indicador), efectuándose la lectura mediante fluorimetría, etc., o bien, el producto de amplificación puede incorporar un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una enzima (marcador), y la sonda se une al otro miembro del par de unión específica, por ejemplo, digoxigenina (indicador), etc., transformándose el sustrato de la enzima en un producto luminiscente o fluorescente y, efectuándose la lectura mediante quimio-luminiscencia, fluorimetría, etc.

En una realización particular, el mareaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de un nucleótido marcado directa o indirectamente con uno o más fluoróforos. En otra realización particular, el mareaje del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de cebadores marcados directa o indirectamente con uno o más fluoróforos.

Los productos de amplificación, opcionalmente marcados, se someten posteriormente a una reacción de fragmentación con el fin de aumentar la eficiencia de la hibridación posterior, obteniéndose de este modo unos productos de

fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar. La fragmentación de los productos de amplificación puede llevarse a cabo por cualquier método convencional, por ejemplo, poniendo en contacto los productos de amplificación con una Dnasa.

5 En caso de que los productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente durante la reacción de amplificación, y en caso de que, tras el proceso de hibridación, no se lleve a cabo una reacción de amplificación o ligación directamente en el soporte, los productos resultantes de la reacción de fragmentación (productos de fragmentación) se someten a un mareaje bien directo utilizando, por ejemplo, fluoróforos, enzimas, isótopos radiactivos, etc. o bien indirecto utilizando, por ejemplo, pares de unión específica que incorporan fluoróforos, enzimas, etc., mediante métodos convencionales. En una realización particular, los productos de amplificación no han sido marcados previamente durante la reacción de amplificación, y los productos de fragmentación se someten a un mareaje directo o indirecto con uno o varios marcadores, por ejemplo, uno o varios fluoróforos, aunque pueden utilizarse otros marcadores conocidos por los expertos en la materia.

15 A continuación, los productos de fragmentación se ponen en contacto con las sondas capaces de detectar las variaciones génicas correspondientes bajo condiciones que permiten la hibridación entre dichos productos de fragmentación y dichas sondas. Dichas sondas están depositadas en un soporte sólido siguiendo una disposición predeterminada, constituyendo un DNA-chip (DNA-chip de la invención), cuyo diseño y desarrollo debe cumplir una serie de requisitos para poder ser utilizado en el método de la invención en cuanto al diseño de las sondas, el número de sondas a depositar por variación génica a detectar, el número de réplicas de sondas a depositar, la distribución de las sondas sobre el soporte, etc. Las características propias de dicho DNA-chip de la invención se describen detalladamente más adelante.

25 La hibridación de los productos de fragmentación con las sondas capaces de detectar las variaciones génicas correspondientes depositadas en un soporte (DNA-chip de la invención) se lleva a cabo por métodos convencionales utilizando dispositivos convencionales. En una realización particular, la hibridación se lleva a cabo en una estación automática de hibridación. Para llevar a cabo la hibridación, los productos de fragmentación se ponen en contacto con dichas sondas (DNA-chip de la invención) bajo condiciones que permiten la hibridación entre dichos productos de fragmentación y dichas sondas. Unas condiciones de hibridación estables permiten establecer la hebra y la longitud apropiada de las sondas con el fin de maximizar la discriminación, tal como se menciona más adelante.

30 Como se ha mencionado previamente, si se desea, cuando dicho soporte es un soporte sólido, tras el proceso de hibridación, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación, por ejemplo, mediante “primer extensión”, o, alternativamente, una reacción de ligación, por ejemplo, mediante un ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), al mismo tiempo que se realiza el mareaje de los oligonucleótidos depositados en el soporte. El mareaje de dichos oligonucleótidos puede ser un mareaje directo utilizando, por ejemplo, fluoróforos, enzimas, isótopos radiactivos, etc. o indirecto utilizando, por ejemplo, pares de unión específica que incorporan fluoróforos, enzimas, etc., mediante métodos convencionales, tal como se ha mencionado previamente en relación con el mareaje de los productos de amplificación o de fragmentación.

40 En caso de que se desee llevar a cabo una reacción de amplificación post-hibridación utilizando, por ejemplo, la metodología “primer extensión”, tras la hibridación, se lleva a cabo una reacción de extensión (amplificación) de los oligonucleótidos hibridados sobre el soporte (portaobjetos de cristal). La extensión, con nucleótidos marcados o a través de un mareaje indirecto, sólo se producirá si el extremo 3' del oligonucleótido híbrida perfectamente con el producto de amplificación.

45 Asimismo, en caso de que se desee realizar una reacción de ligación post-hibridación utilizando, por ejemplo, la metodología “OLA”, tras la hibridación, se lleva a cabo una reacción de ligación de los oligonucleótidos hibridados sobre el soporte (portaobjetos de cristal) con los oligonucleótidos marcados diseñados para hibridar de forma adyacente. La ligación sólo se producirá si el extremo 3' de la sonda depositada sobre el soporte híbrida perfectamente con el producto de amplificación.

55 Finalizado el proceso de hibridación, o, en su caso, dichas reacciones de amplificación o ligación post-hibridación, se procede a la captura de la imagen y a su cuantificación. Para ello, la imagen del DNA-chip hibridado y revelado es recogida con un dispositivo apropiado, por ejemplo, un escáner, procediéndose, a continuación, a cuantificar los valores absolutos de fluorescencia de cada sonda así como del ruido de fondo. Por tanto, en una realización particular, tras la hibridación, o tras las reacciones de amplificación o ligación post-hibridación, el DNA-chip hibridado y revelado se introduce en un escáner donde es sometido a un escaneado para cuantificar la intensidad del mareaje en los puntos donde se ha producido la hibridación. Aunque prácticamente cualquier escáner puede ser utilizado, en una realización particular, dicho escáner es un escáner de fluorescencia confocal. En este caso, el DNA-chip se introduce en el escáner y se escanea la señal emitida por el mareaje al ser excitado por un láser, cuantificándose la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación. En una realización particular, dicho escáner es un escáner de luz blanca. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de escáneres que pueden ser utilizados según la presente invención son escáneres de Axon, Agilent, Perkin Elmer, etc.

65 A continuación se procede al análisis de los datos y a su interpretación, lo que se lleva a cabo mediante el empleo del software de genotipado y algoritmo desarrollado por los inventores.

ES 2 356 458 A1

El análisis de los datos y su interpretación se lleva cabo, en general, mediante el empleo de programas informáticos (software); sin embargo, no todos los programas son apropiados requiriéndose programas que mejoren la calidad de la información obtenida. Los inventores han desarrollado un método secuencial de procesamiento e interpretación de los datos experimentales generados por los DNA-chips de la invención que permite detectar cada una de las variaciones genéticas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método de la invención, en base a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles, tal como se describe a continuación. El algoritmo y software informático desarrollado por los inventores permite facilitar y automatizar la aplicación del método de la invención.

La ejecución del algoritmo y software informático desarrollado por los inventores para procesar secuencialmente e interpretar los datos experimentales generados por los DNA-chips de la invención comprende la realización de serie de etapas para caracterizar cada uno de las variaciones genéticas de interés, concretamente:

- en primer lugar, a los valores absolutos de intensidad de todas las sondas se les resta su propio ruido de fondo;
- a continuación, se agrupan las réplicas correspondientes a cada una de las 4 sondas utilizadas para caracterizar cada variación genética;
- el valor medio de intensidad para cada una de las 4 sondas se calcula usando la media acotada de las réplicas para eliminar los puntos aberrantes;
- conocidos los valores medios de intensidad para cada una de las sondas, se calcula el ratio 1 y el ratio 2, en donde

Ratio 1 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación genética A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 1 que detecta la variación genética A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 2 que detecta la variación genética B y puede calcularse mediante la ecuación:

Intensidad media sonda 1

$$\text{Ratio 1} = \frac{\text{Intensidad media sonda 1}}{\text{Intensidad media sonda 1} + \text{Intensidad media sonda 2}}$$

Ratio 2 es la proporción de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta la variación genética A dividido por la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 3 que detecta la variación genética A más la media acotada de las 10, 8 ó 6 réplicas de la sonda 4 que detecta la variación genética B y puede calcularse mediante la ecuación:

Intensidad media sonda 3

$$\text{Ratio 2} = \frac{\text{Intensidad media sonda 3}}{\text{Intensidad media sonda 3} + \text{Intensidad media sonda 4}}$$

- dichos ratios (ratio 1 y ratio 2) se sustituyen en tres funciones lineales, que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles:

AA Función 1

AB Función 2

BB Función 3

en donde

AA representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación genética A;

AB representa el genotipo de un sujeto heterocigoto para las variaciones genéticas A y B;

BB representa el genotipo de un sujeto homocigoto para la variación genética B;

ES 2 356 458 A1

Función 1 es la Función Lineal que caracteriza a los pacientes con el genotipo AA y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

5 Función 2 es la Función Lineal para el genotipo AB y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

Función 3 es la Función Lineal para el genotipo BB y consiste en una combinación lineal de las variables ratio 1 y ratio 2;

10 en donde las combinaciones lineales están formadas por constantes y cofactores que acompañan a las variables ratio 1 y ratio 2; y

- la función que presente un valor absoluto mayor determina el genotipo que presenta el paciente para la variación génica analizada.

15 Las tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos se corresponden con las tres combinaciones lineales de los ratios 1 y 2 que maximizan la discriminación entre un grupo de sujetos homocigotos AA, heterocigotos AB y homocigotos BB mediante el cálculo de sus correspondientes ratios 1 y 2. El número mínimo de sujetos para calcular unas funciones fiables es 5. Por tanto, en una realización particular, la obtención de dichas funciones se lleva a cabo mediante el análisis de un mínimo de 5 pacientes por cada uno de los tres posibles genotipos de la variación génica (AA, AB, BB). Con los resultados, se calculan los ratios 1 y 2 para los 15 pacientes. Estos ratios sirven como variables de clasificación de los tres grupos para generar las funciones lineales. Con estas tres funciones lineales se evalúa la capacidad discriminatoria de las dos parejas de sondas diseñadas. En caso de que la capacidad de discriminación no sea del 100%, las sondas serían rediseñadas. Nuevos pacientes caracterizados para cada uno de los tres genotipos constituyen nuevos ratios 1 y 2 para perfeccionar las combinaciones lineales de los mismos que constituyen las funciones lineales y, en definitiva, mejorar la capacidad discriminatoria del algoritmo basado en estas tres funciones.

30 En una realización particular en la que el escáner utilizado es un escáner de fluorescencia confocal, siempre que (i) los ratios 1 y 2 se encuentren dentro del rango de los ratios usados para construir las funciones Henales, (ii) la intensidad de fluorescencia media de las 4n réplicas (dónde "n" es el número de réplicas de cada sonda, es decir 6, 8 ó 10), por ejemplo, 40 réplicas con respecto al ruido de fondo sea mayor de 5 y (iii) el coeficiente de variación de las réplicas esté por debajo de 0,25, el resultado clasificatorio de las funciones lineales se considera correcto. Las 35 3 funciones lineales para cada genotipo se construyen a partir de los 15 ratios 1 y 15 ratios 2 obtenidos del análisis con el DNA-chip de 5 pacientes (en una realización particular) por genotipo (5 AA, 5 AB y 5 BB); al analizar un nuevo paciente, se calcularán los ratios 1 y 2 y se sustituirán dichos ratios en las funciones; la función de mayor valor absoluto determina el genotipo. Además, los ratios 1 y 2 del nuevo paciente, por ejemplo AA, deben estar incluidos en los 5 ratios 1 y 2 que permitieron construir la función lineal que determina el grupo AA (se trata, pues, de una doble comprobación).

40 Asimismo, cuando se utiliza un escáner de fluorescencia confocal, para dar por buena una hibridación completa es necesario que (a) la relación intensidad frente a ruido de fondo de todas las sondas del DNA-chip esté por encima de 15; (b) la media de todos los ratios debe superar 0,6 como control de especificidad y sensibilidad; (c) el coeficiente de variación de todas las réplicas debe ser inferior a 0,25; (d) el ratio del control externo debe estar por encima de 0,6 y (e) el control negativo nunca debe ser superior a 3 veces el ruido de fondo. Todas las condiciones (a)-(e) deben ser cumplidas simultáneamente para dar por buena la hibridación completa utilizando un escáner de fluorescencia confocal.

50 Por tanto, según la invención, el genotipado de cada una de las variaciones génicas se lleva a cabo a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica, en la que se eliminan los valores extremos ("outliers"); en una realización particular, dichos valores extremos eliminados constituyen entre el 10% y el 50% de los valores obtenidos. Asimismo, el algoritmo desarrollado por los inventores para el genotipado de cada una de dichas variaciones génicas sujetas a estudio permite detectar 55 cada una de las variaciones génicas en base a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles (AA, AB y BB). Dicho algoritmo comprende una secuencia con los siguientes pasos: utilización de 4 sondas replicadas 6, 8 ó 10 veces; cálculo de la media acotada para calcular la intensidad media de las réplicas; cálculo de los ratios 1 y 2 correspondientes a las 2 parejas de sondas (para la detección de las variaciones génicas A y B); sustitución de los ratios 1 y 2 obtenidos en las ecuaciones lineales obtenidas a partir de los ratios 1 y 2 que discriminaron los "n" pacientes control con genotipo AA, los "n" pacientes control con genotipo AB y los "n" 60 pacientes control con genotipo BB de cada variación génica (en una realización particular "n" es 5); y determinar el genotipo de cada paciente para cada variación génica incluida en el DNA-chip en base al mayor valor absoluto. Por último se comprueba que los ratios se corresponden con los ratios de los "n" pacientes control que determinan cada genotipo. Se han probado otros análisis como por ejemplo, no usar réplicas, no calcular la media acotada, agrupar las 65 réplicas, etc. y se ha observado que no funciona, tener en cuenta sólo los ratios hace que el análisis informático sea más lento, sin embargo, las funciones agilizan el análisis y permiten discriminar más y mejor.

El método de la invención constituye, por tanto, un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo, sensible, específico y reproducible de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto. El método de la invención permite identificar cambios de nucleótidos, inserciones, duplicaciones, deleciones, etc. y determinar el genotipo de un sujeto para una variación génica dada.

Para la puesta en práctica del método de la invención se han desarrollado unos DNA-chips de genotipado útiles para detectar variaciones génicas, cuyas características se mencionan más adelante.

DNA-chips de genotipado

La utilización clínica del método de la invención en la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos requiere la validación previa de los DNA-chips de genotipado utilizados en la puesta en práctica del método de la invención, los cuales presentan un diseño característico.

En general, un DNA-chip de genotipado adecuado para la puesta en práctica del método de la invención, en adelante DNA-chip de la invención, comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas útiles para detectar variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes asociadas a reacciones adversas a fármacos, en donde, por cada variación génica, hay 4 sondas, de las cuales 2 sondas detectan una primera variación génica y las otras 2 detectan una segunda variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas y las dos sondas no tienen por qué ser iguales. Dichas sondas están depositadas siguiendo un patrón determinado y distribuidas homogéneamente entre las 2 áreas que constituyen el DNA-chip pero no agrupadas por variación génica a detectar, es decir, que están distribuidas a lo largo y ancho del chip y además no agrupadas dentro de una misma variación génica.

El DNA-chip de la invención también puede contener, si se desea, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de amplificación y/o hibridación.

Sondas

Diseño de las sondas

Con el fin de disminuir al máximo la tasa de falsos positivos y negativos se diseñan dos parejas de sondas para detectar cada variación génica. Cada pareja de sondas está constituida por una sonda específica para la detección de una variación génica (e.g., el alelo normal) y por otra sonda diseñada para la detección de otra variación génica (e.g., el alelo mutante). En el caso de mutaciones puntuales, la base que difiere entre el alelo normal y el mutante (base a interrogar) se coloca en la posición central de la sonda, lo que asegura la máxima especificidad en la hibridación. En el caso de inserciones, duplicaciones o deleciones son varias las bases que se pueden interrogar. Sin embargo, el diseño se hace completamente equivalente considerando como posición central el primer nucleótido que es diferente en la secuencia normal con respecto a la secuencia mutada.

La capacidad de las sondas específicas de variaciones génicas para discriminar entre las variaciones génicas (e.g., el alelo normal y el alelo mutante) depende de las condiciones de hibridación, de la secuencia que flanquea a la mutación y de la estructura secundaria de la secuencia en la que se quiere detectar la mutación. Unas condiciones de hibridación estables permiten establecer la hebra y la longitud apropiada de las sondas con el fin de maximizar la discriminación. Partiendo de sondas de 25 nucleótidos que detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y otra variación génica (e.g., el alelo mutante) en ambas hebras (hebra sentido y hebra antisentido), se requiere, en general, una media de 8 sondas ensayadas experimentalmente para quedarse con las dos parejas definitivas.

En una realización particular, para cada variación génica a detectar mediante el DNA-chip de la invención, las sondas diseñadas interrogan ambas hebras, con longitudes típicamente comprendidas entre 19 y 27 nucleótidos, y la temperatura de hibridación varía entre 75°C y 85°C.

En caso de que el método de la invención incluye el empleo de la metodología “primer extensión” u “OLA”, se diseñan igualmente 4 sondas, 2 de dichas sondas detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y las otras 2 sondas detectan la otra variación génica (e.g., el alelo mutante). En este caso, la base interrogada no se coloca en la posición central sino en la posición 3’ de la sonda. En el caso de la metodología “OLA”, se diseñan unos oligonucleótidos marcados directa o indirectamente que hibridan a continuación de las sondas depositadas en el soporte sólido para permitir la reacción de ligación.

Dado que el método de la invención puede ser utilizado para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, la naturaleza de las sondas presentes en el DNA-chip de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo ya que, en cada caso, se pueden seleccionar las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar; en particular, dichas sondas son unas sondas útiles para la detección de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos. En la Tabla 1 se incluye una relación de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos. No obstante, se pueden ir incorporando en los DNA-chips de la invención sondas que permitan la identificación de otras variaciones génicas asociadas con dichas enfermedades o con el reconocimiento de antígenos de interés a medida que se vayan identificando.

Disposición de las sondas en el soporte

Según la invención, se usan 4 sondas (es decir, 2 parejas de sondas) por cada variación génica a detectar que se depositan sobre el soporte sólido siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar. Dos de dichas sondas detectan una variación génica (e.g., el alelo normal) y las otras dos sondas detectan otra variación génica (e.g., el alelo mutante). El número de réplicas de cada una de dichas sondas en el DNA-chip de la invención es de 10, 8 ó 6 réplicas. En una realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 10 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica; en otra realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 8 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica; y, en otra realización particular, el DNA-chip de la invención comprende 6 réplicas de cada una de las 4 sondas utilizadas para detectar cada variación génica.

La disposición (colocación) de las sondas en el soporte está predeterminada. En una realización particular, las sondas depositadas en el soporte, aunque mantienen una disposición predeterminada, no están agrupadas por variación génica sino que tienen una distribución al azar, la cual, si se desea, puede ser siempre la misma.

Controles

El DNA-chip de la invención también puede contener, si se desea, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de amplificación y/o hibridación.

En una realización particular, el DNA-chip de la invención comprende unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de hibridación. En general, cada uno de los subarrays, típicamente 16, que constituyen un DNA-chip, está flanqueado por unos controles externos de hibridación que permiten localizar fácilmente los puntos sobre el soporte. Aunque con la misma secuencia, el DNA-chip dispone de dos controles externos de hibridación marcados, por ejemplo, con un fluoróforo (e.g., Cy3, Cy5, etc.), que sirven para evaluar la calidad de la hibridación en ambos canales. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos del control externo es la siguiente (5' → 3'):

CEH: GTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGAGTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGA

y las secuencias de los oligonucleótidos para su detección son las siguientes:

ON1: CTTGACGACTCCTGAACGG

ON2: CTTGACGACACCTGAACGG

Soporte

El soporte sobre el que están depositadas la pluralidad de sondas puede ser cualquier superficie sólida sobre la que se puedan unir oligonucleótidos. Prácticamente cualquier soporte sobre el que pueda unirse o inmovilizarse un oligonucleótido, utilizado en la producción de DNA-chips, puede ser utilizado para la puesta en práctica de esta invención. A modo ilustrativo, dicho soporte puede ser un soporte no poroso, por ejemplo, un soporte de cristal, silicio, plástico, etc., o bien un soporte poroso, por ejemplo, membranas (nylon, nitrocelulosa, etc.), micropartículas, etc. En una realización particular, dicho soporte es un portaobjetos (porta) de cristal.

Unión de las sondas al soporte

Las sondas se inmovilizan (unen) sobre el soporte utilizando técnicas convencionales de inmovilización de oligonucleótidos sobre la superficie de los soportes. Dichas técnicas dependen, entre otros factores, de la naturaleza del soporte utilizado [porosa (membranas, micropartículas, etc.) o no porosa (cristal, plástico, silicio, etc.)]. En general, las sondas pueden inmovilizarse sobre el soporte mediante el empleo de técnicas de inmovilización no covalentes o bien mediante el empleo de técnicas de inmovilización basadas en la unión covalente de las sondas a la superficie del soporte mediante procedimientos químicos.

La preparación de soportes no porosos (e.g., cristal, silicio, plástico, etc.) requiere, en general, un tratamiento previo con grupos reactivos (e.g., amino, aldehído, etc.) o bien recubrir la superficie del soporte con un miembro de un par de unión específica (e.g., avidina, estreptavidina, etc.). Asimismo, en general, resulta conveniente activar previamente las sondas a inmovilizar mediante grupos tiol, amino, etc., o biotina, etc., con el fin de conseguir una inmovilización específica de las sondas sobre el soporte.

La inmovilización de las sondas en el soporte puede llevarse a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas basadas en la síntesis *in situ* de las sondas sobre el propio soporte (e.g., fotolitografía, síntesis química directa, etc.), o mediante técnicas basadas en el empleo de brazos robotizados que depositan la sonda correspondiente presintetizada (impresión sin contacto, impresión por contacto, etc.), etc..

ES 2 356 458 A1

La disposición (colocación) de las sondas en el soporte está predeterminada. En una realización particular, las sondas depositadas en el soporte sólido, aunque mantienen una disposición predeterminada, no están agrupadas por variación génica sino que tienen una distribución al azar, la cual, si se desea, puede ser siempre la misma.

5 En una realización particular, el soporte es un portaobjetos de cristal, y, en este caso, las sondas, en el número de réplicas establecido (6, 8 ó 10), se imprimen en portas de cristal previamente tratados, por ejemplo, aminosilanzados, usando un equipo de producción automática de DNA-chips por deposición de los oligonucleótidos en el portaobjetos de cristal ("microarrayer") bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado (80°C), manteniendo controlada la humedad y temperatura durante el proceso de deposición, típicamente entre 40-50% de humedad relativa y 20°C de temperatura.

10 Las réplicas (sondas) se distribuyen en las placas de impresión, que contienen los oligonucleótidos en solución, de forma que las impriman un número de puntas distintas igual a la mitad de las réplicas. Las réplicas se distribuyen homogéneamente entre las áreas o sectores (sub-arrays) que constituyen el DNA-chip. El número de réplicas así como su homogénea distribución a lo largo y ancho del DNA-chip minimizan la variabilidad experimental proveniente de los procesos de impresión e hibridación. Asimismo, se imprimen controles positivos y negativos de hibridación. En general, cada uno de los sub-arrays que constituyen el DNA-chip está flanqueado por unos controles externos de hibridación que permiten localizar fácilmente los puntos sobre el soporte. Aunque con la misma secuencia, el DNA-chip dispone de dos controles externos de hibridación marcados, por ejemplo, con un fluoróforo (e.g., Cy3, Cy5, etc.), que sirven para evaluar la calidad de la hibridación en ambos canales. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos del control externo es la identificada previamente como "CEH" y las secuencias de los oligonucleótidos para su detección son las identificadas previamente como ON1 y ON2.

25 Para controlar la calidad del proceso de fabricación del DNA-chip en términos de señal de hibridación, ruido de fondo, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad de cada réplica (coeficiente de variación) así como del tamaño y forma de los puntos impresos (sondas) se puede utilizar un DNA comercial. A modo ilustrativo, como control de calidad de la impresión de los DNA-chips de la invención, se lleva a cabo la hibridación con un DNA comercial (e.g., k562 DNA High Molecular Weight, Promega) de uno de cada un número determinado de soportes cargados con las sondas, por ejemplo, cada 20 soportes impresos. En primer lugar, se analiza la forma y tamaño de los puntos impresos. En esta hibridación se controlan los mismos parámetros que se han explicado previamente para aceptar un genotipado con el DNA-chip de la invención en cuanto a la relación entre la intensidad y el ruido de fondo del DNA-chip, especificidad - sensibilidad media y reproducibilidad de las réplicas (coeficiente de variación). Asimismo se comprueba el correcto genotipado de ese DNA control.

35 Los DNA-chips de la invención pueden ser utilizados, en combinación con el método de la invención, para detectar variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, para lo cual se utilizarán las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar. Una ventaja de los DNA-chips de la invención radica en que pueden incorporar sondas que permitan la identificación de otras variaciones génicas asociadas con reacciones adversas a fármacos a medida que se vayan identificando tales variaciones génicas; para ello, se deberán diseñar las sondas y los DNA-chips de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, tal como se ha mencionado previamente.

40 Los inventores han diseñado, producido y validado la utilización clínica del método de la invención en la detección de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos mediante el desarrollo (diseño y producción) del DNA-chip correspondiente. Por tanto, en una realización particular, el DNA-chip de la invención es un DNA-chip que permite la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos que pueden ser identificados se recogen en la Tabla 3; no obstante, la relación de variaciones génicas contenida en dicha tabla puede incrementarse con otras variaciones génicas que vayan identificándose posteriormente y que estén asociadas a reacciones adversas a fármacos.

50

TABLA 1

Variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos

55 el polimorfismo Arg389Gly en el Receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1),
los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu en el Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2),
60 el polimorfismo Ser9Gly del Receptor dopaminérgico D3 (DRD3),
los polimorfismos His452Tyr y T102C del Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A),
el polimorfismo Val108Met de Catecol-O-metiltransferasa (COMT),
65 el polimorfismo Ile105Val de Glutathion S transferasa clase 1 (GSTP1),
el polimorfismo Gly460Trp de Aducina 1 (ADD1),

ES 2 356 458 A1

TABLA 1 (continuación)

5 el polimorfismo Arg399Gln de la Proteína de reparación de DNA XRCC1,
el polimorfismo Ile462Val del citocromo P450 1A1 (CYP1A1),
el polimorfismo A1166C del Receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1),
el polimorfismo C-58T del receptor B2 de bradikina (BDKRB2),
10 el polimorfismo Met235Thr de Angiotensinógeno (AGT),
los polimorfismos C430T, A1075C, 818delA, T1076C y C1080G del citocromo P450 2C9 (CYP2C9),
15 los polimorfismos H324P, V136V, V11M, C882G, C1038T, G4180C, A1847G, C-1584G, C100T, 138insT,
C1023T, G1659A, 1707T/del, G1758A/T, 1863ins9bp, 1973insG, 2539delAACT, 2549A/del,
2613delAGA, C2850T, G3183A, C3198G, T3277C, G4042A y 4125insGTGCCCACT del citocromo P450
2D6 (CYP2D6),
los polimorfismos A805T, G416A, A1196G y C792G del citocromo P450 2C8 (CYP2C8),
20 los polimorfismos T341C, C481T, A803G, C282T, G590A, G857A y G191A de N-acetiltransferasa 2
(NAT2),
los polimorfismos G636A, G681A, C680T, A1G, IVS5+2T>A, T358C, G431A y C1297T del citocromo
25 P450 2C19 (CYP2C19),
el polimorfismo C2664T del receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B
(GRIN2B),
el polimorfismo C3435T de la glicoproteína P (ABCB1),
30 los polimorfismos A719G y G238C de Tiopurinmetiltransferasa (TPMT),
el polimorfismo C677T de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (TPMT),
los polimorfismos Asp70Gly y Ala539Thr de Butirilcolinesterasa (BCHE),
35 el polimorfismo A-392G del citocromo P450 3A4 (CYP3A4),
los polimorfismos A-163C, A-3860G, G3534A y C558A del citocromo P450 1A2 (CYP1A2),
40 los polimorfismos G14690A, C3699T, G19386A, T29753C y G6986A del citocromo P450 3A5 (CYP3A5),
el polimorfismo 44bp delección del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4),
el polimorfismo delAGA (alelo*B) de Glutation S-transferasa M3 (GSTM3),
45 el polimorfismo alelo nulo de Glutation S-transferasa M1 (GSTM1),
el polimorfismo alelo nulo de Glutation S-transferasa n1 (GSTT1),
los polimorfismos Cys112Arg y Arg158Cys de apolipoproteína E (APOE),
50 el polimorfismo G-308A de Tumor necrosis factor (TNF), y
el polimorfismo G-1082A de Interleukina 10 (IL10)

55

Las secuencias de todos los genes mencionados en la Tabla 1 son conocidas y están recogidas, entre otras, en las siguientes páginas webs: GeneBank (NCBI), GeneCard (Weizmann Institute of Sciences) y Snpper.chip.org (Innate Immunity PGA).

60 *Kits*

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para la puesta en práctica del método de la invención, en adelante kit de la invención, que comprende:

65

- un DNA-chip de la invención que comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas que permiten la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos presentes en uno o más genes;

ES 2 356 458 A1

- un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en el método de la invención que comprende el empleo de un algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método; y, opcionalmente,
- 5 - un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación del método de la invención.

10 El kit de la invención puede contener, además, si se desea, unos controles positivos y negativos de la reacción de hibridación.

Las características del DNA-chip de la invención, método de la invención y algoritmo proporcionado por esta invención ya han sido descritas previamente.

15 El kit de la invención puede ser utilizado para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, para lo cual se seleccionarán las sondas adecuadas para las variaciones génicas que se desean detectar.

20 En otra realización particular, la invención se relaciona con un kit para la predicción *in vitro* de la respuesta a tratamientos farmacológicos o para la detección *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, que comprende:

- un DNA-chip de la invención que comprende un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas que permiten la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos;
- 25 - un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en el método de la invención que comprende el empleo de un algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método; y, opcionalmente,
- 30 - un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación del método de la invención para detectar variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos.

35 En una realización concreta, el kit de la invención comprende un DNA-chip de la invención que comprende, depositadas sobre un soporte siguiendo un patrón determinado, unas sondas que permiten la detección de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos, en donde dichas variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos se seleccionan del grupo de variaciones génicas en la Tabla 1 y combinaciones de las mismas.

40 *Oligonucleótidos cebadores*

Para la validación del método de la invención, se han diseñado y validado unos oligonucleótidos cebadores capaces de amplificar, mediante PCR multiplex, las regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos cuyas secuencias corresponden a SEQ ID NO: 1-130 (en el Ejemplo 1 se indican las parejas de oligonucleótidos cebadores que amplifican las regiones DNA diana que contienen las variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos a amplificar).

50 Dichos oligonucleótidos cebadores presentan la ventaja de que permiten la amplificación específica de dichas regiones DNA diana en un número de reacciones PCR muy bajo, concretamente:

- en el caso del DNA-chip que permite la detección de variaciones génicas asociadas a las reacciones adversas a fármacos se amplifican, en tan sólo 4 reacciones de PCR multiplex, los 65 fragmentos necesarios para el genotipado de las 89 variaciones génicas que se analizan en el DNA-chip de la invención para la detección de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos indicadas en el Ejemplo 1.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

60 Ejemplo 1

Detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, utilizando un DNA-chip

65 1.1 *Diseño del DNA-chip para la detección de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos*

Se diseñó y fabricó un DNA-chip para detectar reacciones farmacológicas adversas que permite la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos. Ejemplos

ES 2 356 458 A1

ilustrativos de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos que pueden ser determinados utilizando este DNA-chip se mencionan en la Tabla 3.

5 En este caso concreto, el DNA-chip diseñado y fabricado consta de un soporte que contiene sobre su superficie una pluralidad de sondas que permiten la detección de las variaciones génicas mencionadas anteriormente. Estas sondas son capaces de hibridar con las secuencias diana amplificadas de genes asociados con reacciones adversas a fármacos cuya variación génica se desea estudiar. Las secuencias de DNA de cada una de las sondas utilizadas son las siguientes [en general, se indica el nombre del gen y la variación génica (cambio del aminoácido, cambio de nucleótido, “ins”: inserción, “del”: delección)]:

10 1.- *Receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) Arg389Gly* (sondas para detectar el polimorfismo Arg389Gly en el gen del receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1)

15 **AAGGCCTTCCAGCGACTGCTCTGCT**

AAGGCCTTCCAGGGACTGCTCTGCT

AGCAGAGCAGTCGCTGGAAGGCCTT

20 **AGCAGAGCAGTCCCTGGAAGGCCTT**

25 2.- *Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) Arg16Gly*

CTGGCACCCAATGGAAGCCATGCGC

CTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGC

30 **GCGCATGGCTTCCATTGGGTGCCAG**

GCGCATGGCTTCTATTGGGTGCCAG

35

3.- *Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) Gln27Glu*

40 **GACGTCACGCAGCAAAGGGACGAGG**

GACGTCACGCAGGAAAGGGACGAGG

CCTCGTCCCTTTGCTGCGTGACGTC

45 **CCTCGTCCCTTTCCTGCGTGACGTC**

50 4.- *Receptor dopaminérgico D3 (DRD3) Ser9Gly*

AGTTCAGGTGGCCACTCAGCTGGCT

55 **AGTTCAGGTGGCTACTCAGCTGGCT**

AGCCAGCTGAGTGGCCACCTGAACT

AGCCAGCTGAGTAGCCACCTGAACT

60

65

ES 2 356 458 A1

5.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) His452Tyr

5 CTAGGAAAGCAGCATTCTGAAGAGG
CTAGGAAAGCAGTATTCTGAAGAGG
10 CCTCTTCAGAATGCTGCTTTCCTAG
CCTCTTCAGAATACTGCTTTCCTAG

6.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) T102C

15 GTTAGCTTCTCCGGAGTTAAAGTCA
GTTAGCTTCTCCAGAGTTAAAGTCA
20 TGACTTTAACTCCGGAGAAGCTAAC
TGACTTTAACTCTGGAGAAGCTAAC

7.- Catecol-O-metiltransferasa (COMT) Val108Met

25 GATTTGCTGGCGTGAAGGACAAGG
30 GATTTGCTGGCATGAAGGACAAGG
CCTTGTCCTTCACGCCAGCGAAATC
35 CCTTGTCCTTCATGCCAGCGAAATC

8.- Glutation S transferasa clase 1 (GSTP1) Me105Val

40 CGCTGCAAATACATCTCCCTCATCT
CGCTGCAAATACGTCTCCCTCATCT
45 AGATGAGGGAGATGTATTTGCAGCG
AGATGAGGGAGACGTATTTGCAGCG

9.- Aducina 1 (ADD1) Gly460Trp

55 GCTTCCGAGGAAGGGCAGAATGGAA
GCTTCCGAGGAATGGCAGAATGGAA
60 TTCCATTCTGCCCTTCCTCGGAAGC
TTCCATTCTGCCATTTCCTCGGAAGC

65

ES 2 356 458 A1

10.- *Proteína de reparación de DNA XRCC1 Arg399Gln*

5 GGCTGCCCTCCCGGAGGTAAGGCCT
GGCTGCCCTCCCAGAGGTAAGGCCT
AGGCCTTACCTCCGGGAGGGCAGCC
10 AGGCCTTACCTCTGGGAGGGCAGCC

11.- *Citocromo P450 1A1 (CYP1A1) Ile462Val*

15 ATCGGTGAGACCATTGCCCGCTGGG
ATCGGTGAGACCGTTGCCCGCTGGG
20 CCCAGCGGGCAATGGTCTCACCGAT
CCCAGCGGGCAACGGTCTCACCGAT

12.- *Receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) A1166C*

25 TACCAAATGAGCATTAGCTACTTTT
30 TACCAAATGAGCCTTAGCTACTTTT
AAAAGTAGCTAATGCTCATTTGGTA
35 AAAAGTAGCTAAGGCTCATTTGGTA

13.- *Receptor B2 de bradikina (BDKRB2) C-58T*

40 TGCCATCTAACCATCTTTTCTTCTC
TGCCATCTAACCGTCTTTTCTTCTC
45 GAGAAGAAAAGATGGTTAGATGGCA
GAGAAGAAAAGACGGTTAGATGGCA

14.- *Angiotensinógeno (AGT) Met235Thr*

50 GCTGCTCCCTGACGGGAGCCAGTGT
55 GCTGCTCCCTGATGGGAGCCAGTGT
ACACTGGCTCCCGTCAGGGAGCAGC
60 ACACTGGCTCCCATCAGGGAGCAGC

65

ES 2 356 458 A1

15.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) C430T*

5 AGCATTGAGGACCGTGTTCAAGAGG
AGCATTGAGGACTGTGTTCAAGAGG
CCTCTTGAACACGGTCCTCAATGCT
10 CCTCTTGAACACAGTCCTCAATGCT

16.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) A1075C*

15 GTCCAGAGATACATTGACCTTCTCC
GTCCAGAGATACCTTGACCTTCTCC
20 GGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGAC
GGAGAAGGTCAAGGTATCTCTGGAC

25 17.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) 818delA*

TGAAAATGGAGAAGGTAAAATGTAA
30 TGAAAATGGAGAGGTAAAATGTAAA
TTACATTTTACCTTCTCCATTTTCA
TTTACATTTTACCTTCTCCATTTTCA

35

18.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) T1076C*

40 TCCAGAGATACATTGACCTTCTCCC
TCCAGAGATACACTGACCTTCTCCC
GGGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGA
45 GGGAGAAGGTCAGTGTATCTCTGGA

19.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) C1080G*

50 GAGATACATTGACCTTCTCCCCACC
GAGATACATTGAGCTTCTCCCCACC
GGTGGGGAGAAGGTCAATGTATCTC
55 GGTGGGGAGAAGCTCAATGTATCTC

20.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) H324P*

60 TGCACATCCGGAGGTAGGATCATGA
TGCACATCCGGATGTAGGATCATGA
65 TCATGATCCTACCTCCGGATGTGCA
TCATGATCCTACATCCGGATGTGCA

ES 2 356 458 A1

21.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) V136V*

5 GCGCTTCTCCGTGTCCACCTTGCGC
GCGCTTCTCCGTCTCCACCTTGCGC
GCGCAAGGTGGACACGGAGAAGCGC
10 GCGCAAGGTGGAGACGGAGAAGCGC

22.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) V11M*

15 GTGCCCCTGGCCGTGATAGTGGCCA
GTGCCCCTGGCCATGATAGTGGCCA
20 TGGCCACTATCACGGCCAGGGGCAC
TGGCCACTATCATGGCCAGGGGCAC

23.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C882G*

30 GCGGCGCCGCAACTGCAGAGGGAGG
GCGGCGCCGCAAGTGCAGAGGGAGG
CCTCCCTCTGCAGTTGCGGCGCCGC
35 CCTCCCTCTGCACTTGCGGCGCCGC

24.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C1038T*

40 GATCCTGGGTTTTCGGGCCGCGTTCC
GATCCTGGGTTTTGGGCCGCGTTCC
45 GGAACGCGGCCCGAAACCCAGGATC
GGAACGCGGCCCAAACCCAGGATC

25.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G4180C*

55 CTTTCCTGGTGAGCCCATCCCCCTA
CTTTCCTGGTGACCCCATCCCCCTA
TAGGGGGATGGGCTCACCAGGAAAG
60 TAGGGGGATGGGGTCACCAGGAAAG

65

ES 2 356 458 A1

26.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) A1847G*

5 CTCCCACCCCCAGGACGCCCTTTC
CTCCCACCCCCAAGACGCCCTTTC
GAAAGGGGCGTCCTGGGGGTGGGAG
10 GAAAGGGGCGTCTTGGGGGTGGGAG

27.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C-1584G*

15 CTTGGAAGAACCCGGTCTCTACAAA
CTTGGAAGAACCCGGTCTCTACAAA
20 TTTGTAGAGACCGGGTTCTTCCAAG
TTTGTAGAGACCCGGTCTTCCAAG

28.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C100T*

GCTGCACGCTACCCACCAGGCCCCC
30 GCTGCACGCTACTCACCAGGCCCCC
GGGGGCCTGGTGGGTAGCGTGCAGC
GGGGGCCTGGTGAGTAGCGTGCAGC

35

29.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 138insT*

40 GCTGGGCAACCTGCTGCATGTGGAC
GCTGGGCAACCTTGCTGCATGTGGA
GTCCACATGCAGCAGGTTGCCCAGC
45 TCCACATGCAGCAAGGTTGCCCAGC

30.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C1023T*

50 CTGTGCCCATCACCCAGATCCTGGG
CTGTGCCCATCATCCAGATCCTGGG
55 CCCAGGATCTGGGTGATGGGCACAG
CCCAGGATCTGGATGATGGGCACAG

31.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G1659A*

60 AGGCGCTTCTCCGTGTCCACCTTGC
AGGCGCTTCTCCATGTCCACCTTGC
65 GCAAGGTGGACACGGAGAAGCGCCT
GCAAGGTGGACATGGAGAAGCGCCT

ES 2 356 458 A1

32.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 1707T/del*

5 TCGCTGGAGCAGTGGGTGACCGAGG
TCGCTGGAGCAGGGGTGACCGAGGA
CCTCGGTCACCCACTGCTCCAGCGA
10 TCCTCGGTCACCCCTGCTCCAGCGA

33.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G1758A*

15 GCCAACCACTCCGGTGGGTGATGGG
GCCAACCACTCCAGTGGGTGATGGG
20 CCCATCACCCACCGGAGTGGTTGGC
CCCATCACCCACTGGAGTGGTTGGC

34.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G1758T*

25
30 GCCAACCACTCCGGTGGGTGATGGG
GCCAACCACTCCTGTGGGTGATGGG
CCCATCACCCACCGGAGTGGTTGGC
35 CCCATCACCCACAGGAGTGGTTGGC

40 35.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 1863ins9bp*

45 CCCTTTCGCCCAACGGTCTCTTGG
CCCTTTCGCCCTTTCGCCCAACG
CCAAGAGACCGTTGGGGCGAAAGGG
CGTTGGGGCGAAAGGGGCGAAAGGG

36.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 1973insG*

55 ACCTAGCTCAGGAGGGACTGAAGGA
ACCTAGCTCAGGGAGGGACTGAAGG
60 TCCTTCAGTCCCTCCTGAGCTAGGT
CCTTCAGTCCCTCCTGAGCTAGGT

65

ES 2 356 458 A1

37.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 2539delAACT*

5 GGATGAGCTGCTAACTGAGCACAGG
GGATGAGCTGCTGAGCACAGGATGA
CCTGTGCTCAGTTAGCAGCTCATCC
10 TCATCCTGTGCTCAGCAGCTCATCC

38.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 2549A/del*

15 CTAAGTGAAGCACAGGATGACCTGGG
CTAAGTGAAGCACAGGATGACCTGGGA
20 CCCAGGTCATCCTGTGCTCAGTTAG
TCCCAGGTCATCCGTGCTCAGTTAG

39.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 2613delAGA*

25
30 TGGCAGAGATGGAGAAGGTGAGAGT
TGGCAGAGATGGAGGTGAGAGTGGC
ACTCTCACCTTCTCCATCTCTGCCA
35 GCCACTCTCACCTCCATCTCTGCCA

40.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C2850T*

40 GATGAGAACCTGCGCATAGTGGTGG
45 GATGAGAACCTGTGCATAGTGGTGG
CCACCACTATGCGCAGGTTCTCATC
CCACCACTATGCACAGGTTCTCATC

41.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G3183A*

55 GAGATCGACGACGTGATAGGGCAGG
GAGATCGACGACATGATAGGGCAGG
60 CCTGCCCTATCACGTCGTCGATCTC
CCTGCCCTATCATGTCGTCGATCTC

65

ES 2 356 458 A1

42.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) C3198G*

ATAGGGCAGGTGCGGCGACCAGAGA
5 ATAGGGCAGGTGGGGCGACCAGAGA
TCTCTGGTCGCCGCACCTGCCCTAT
10 TCTCTGGTCGCCCCACCTGCCCTAT

43.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) T3277C*

15 GCTTTGGGGACATCGTCCCCCTGGG
GCTTTGGGGACACCGTCCCCCTGGG
20 CCCAGGGGGACGATGTCCCCAAAGC
CCCAGGGGGACGGTGTCCCCAAAGC

44.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) G4042A*

25 TCCCCACAGGCCGCGTGCATGCCT
30 TCCCCACAGGCCACCGTGCATGCCT
AGGCATGCACGGCGGCCTGTGGGGA
35 AGGCATGCACGGTGGCCTGTGGGGA

45.- *Citocromo P450 2D6 (CYP2D6) 4125insGTGCCCACT*

40 TCGGTGCCCACTGGACAGCCCCGGC
TCGGTGCCCACTGTGCCCACTGGAC
45 GCCGGGGCTGTCCAGTGGGCACCGA
GTCCAGTGGGCACAGTGGGCACCGA

46.- *Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) A805T*

50 GATTGCTTCCTGATCAAAATGGAGC
55 GATTGCTTCCTGTTCAAAATGGAGC
GCTCCATTTTGATCAGGAAGCAATC
60 GCTCCATTTTGAACAGGAAGCAATC

65

ES 2 356 458 A1

47.- *Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) G416A*

5 GGATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGA
GGATGGGGAAGAAGAGCATTGAGGA
TCCTCAATGCTCCTCTTCCCCATCC
10 TCCTCAATGCTCTTCTTCCCCATCC

48.- *Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) A1196G*

15 TTAGGAAATTCTTTGTCATCATGTA
TTAGGAAATTCTCTGTCATCATGTA
20 TACATGATGACAAAGAATTCCTAA
TACATGATGACAGAGAATTCCTAA

49.- *Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) C792G*

25 TCGGGACTTTATCGATTGCTTCCTG
30 TCGGGACTTTATGGATTGCTTCCTG
CAGGAAGCAATCGATAAAGTCCCGA
35 CAGGAAGCAATCCATAAAGTCCCGA

50.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) T341C*

40 TGCAGGTGACCATTGACGGCAGGAA
TGCAGGTGACCACTGACGGCAGGAA
45 TTCCTGCCGTCAATGGTCACCTGCA
TTCCTGCCGTCAAGTGGTCACCTGCA

51.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) C481T*

55 GGAATCTGGTACCTGGACCAAATCA
GGAATCTGGTACTTGGACCAAATCA
TGATTTGGTCCAGGTACCAGATTCC
60 TGATTTGGTCCAAGTACCAGATTCC

65

ES 2 356 458 A1

52.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) A803G*

5 AAGAAGTGCTGAAAAATATATTTAA
AAGAAGTGCTGAGAAATATATTTAA
TTAAATATATTTTTTCAGCACTTCTT
10 TTAAATATATTTTCTCAGCACTTCTT

53.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) C282T*

15 AGGGTATTTTTACATCCCTCCAGTT
AGGGTATTTTTATATCCCTCCAGTT
20 AACTGGAGGGATGTAAAAATACCCT
AACTGGAGGGATATAAAAAATACCCT

54.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G590A*

25
30 CGCTTGAACCTCGAACAATTGAAGA
CGCTTGAACCTCAAACAATTGAAGA
TCTTCAATTGTTGAGGTTCAAGCG
35 TCTTCAATTGTTGAGGTTCAAGCG

55.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G857A*

40 AACCTGGTGATGGATCCCTTACTAT
AACCTGGTGATGAATCCCTTACTAT
45 ATAGTAAGGGATCCATCACCAGGTT
ATAGTAAGGGATTCATCACCAGGTT

56.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G191A*

55 TAAGAAGAAACCGGGTGGGTGGTG
TAAGAAGAAACCAGGGTGGGTGGTG
CACCACCCACCCGGTTTCTTCTTA
60 CACCACCCACCCTGGTTTCTTCTTA

65

ES 2 356 458 A1

57.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G636A*

5 AAGCACCCCCTGGATCCAGGTAAGG
AAGCACCCCCTGAATCCAGGTAAGG
CCTTACCTGGATCCAGGGGGTGCTT
10 CCTTACCTGGATTCAGGGGGTGCTT

58.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G681A*

15 TGATTATTTCCCGGGAACCCATAAC
TGATTATTTCCAGGAACCCATAAC
20 GTTATGGGTTCCCGGGAATAATCA
GTTATGGGTTCTGGGAATAATCA

59.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C680T*

30 TTGATTATTTCCCGGGAACCCATAA
TTGATTATTTCTGGGAACCCATAA
TTATGGGTTCCCGGGAATAATCAA
35 TTATGGGTTCCAGGAATAATCAA

60.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) A1G*

40 GAGAAGGCTTCAATGGATCCTTTTG
GAGAAGGCTTCAGTGGATCCTTTTG
45 CAAAAGGATCCATTGAAGCCTTCTC
CAAAAGGATCCACTGAAGCCTTCTC

61.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) IVS5+2T>A*

55 AAATGGAGAAGGTAAAATGTTAACA
AAATGGAGAAGGAAAAATGTTAACA
TGTTAACATTTTACCTTCTCCATTT
60 TGTTAACATTTTTCTTCTCCATTT

65

ES 2 356 458 A1

62.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) T358C*

5 AATGGAAAGAGATGGAAGGAGATCC
AATGGAAAGAGACGGAAGGAGATCC
GGATCTCCTTCCATCTCTTTCCATT
10 GGATCTCCTTCCGTCTCTTTCCATT

63.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G431A*

15 GCATTGAGGACCGTGTTCAAGAGGA
GCATTGAGGACCATGTTCAAGAGGA
20 TCCTCTTGAACACGGTCCTCAATGC
TCCTCTTGAACATGGTCCTCAATGC

64.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C1297T*

30 TTTTCAGGAAAACGGATTTGTGTGG
TTTTCAGGAAAATGGATTTGTGTGG
CCACACAAATCCGTTTTCTGAAAA
35 CCACACAAATCCATTTTCTGAAAA

65.- *Receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B) C2664T*

40 GTTCATGGTTGCGGTGGGGGAGTTC
45 GTTCATGGTTGCAGTGGGGGAGTTC
GAACTCCCCACCGCAACCATGAAC
GAACTCCCCACTGCAACCATGAAC

66.- *Glicoproteína P (ABCB1) C3435T*

55 TGCTGCCCTCACAATCTCTTCCTGT
TGCTGCCCTCACGATCTCTTCCTGT
60 ACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCA
ACAGGAAGAGATCGTGAGGGCAGCA

65

ES 2 356 458 A1

67.- *Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) A719G*

5 TTGAAAAGTTATATCTACTTACAGA
TTGAAAAGTTATGTCTACTTACAGA
TCTGTAAGTAGATATAACTTTTCAA
10 TCTGTAAGTAGACATAACTTTTCAA

68.- *Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) G238C*

15 GTCCCCGGTCTGGAAACCTGCATAA
GTCCCCGGTCTGCAAACCTGCATAA
20 TTATGCAGGTTTCCAGACCGGGGAC
TTATGCAGGTTTGCAGACCGGGGAC

69.- *5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T*

25
30 TGTCTGCGGGAGCCGATTTTCATCAT
TGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCAT
ATGATGAAATCGGCTCCCGCAGACA
35 ATGATGAAATCGACTCCCGCAGACA

70.- *Butirilcolinesterasa (BCHE) Asp70Gly*

40 GTCAGAACATAGATCAAAGTTTTCC
GTCAGAACATAGGTCAAAGTTTTCC
45 GGAAAACCTTTGATCTATGTTCTGAC
GGAAAACCTTTGACCTATGTTCTGAC

71.- *Butirilcolinesterasa (BCHE) Ala539Thr*

50
55 AATATTGATGAAGCAGAATGGGAGT
AATATTGATGAAACAGAATGGGAGT
60 ACTCCCATTCTGCTTCATCAATATT
ACTCCCATTCTGTTTCATCAATATT

65

ES 2 356 458 A1

72.- *Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) A-392G*

5 GAGACAAGGGCAAGAGAGAGGCGAT
GAGACAAGGGCAGGAGAGAGGCGAT
ATCGCCTCTCTCTTGCCCTTGTCTC
10 ATCGCCTCTCTCCTGCCCTTGTCTC

73.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-163C*

15 AGCTCTGTGGGCACAGGACGCATGG
AGCTCTGTGGGCCAGGACGCATGG
20 CCATGCGTCCTGTGCCACAGAGCT
CCATGCGTCCTGGGCCACAGAGCT

74.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-3860G*

25
30 CCTCCGCCTCTCGGATTCAAGCAAT
CCTCCGCCTCTCAGATTCAAGCAAT
ATTGCTTGAATCCGAGAGGCGGAGG
35 ATTGCTTGAATCTGAGAGGCGGAGG

75.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) G3534A*

40 CAACCATGACCCGTGAGTACATACC
CAACCATGACCCATGAGTACATACC
45 GGTATGTACTIONCACGGGTCATGGTTG
GGTATGTACTIONCATGGGTCATGGTTG

76.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) C558A*

50
55 GCCTGGGCACTTCGACCCTTACAAT
GCCTGGGCACTTAGACCCTTACAAT
ATTGTAAGGGTCTAAGTGCCCAGGC
60 ATTGTAAGGGTCTAAGTGCCCAGGC

65

ES 2 356 458 A1

77.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G14690A*

5 GGAGAGCACTAAGAAGTTCCTAAAA
GGAGAGCACTAAAAAGTTCCTAAAA
TTTTAGGAACTTCTTAGTGCTCTCC
10 TTTTAGGAACTTTTTAGTGCTCTCC

78.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) C3699T*

15 AGATATGGGACCCGTACACATGGAC
AGATATGGGACCTGTACACATGGAC
20 GTCCATGTGTACGGGTCCCATATCT
GTCCATGTGTACAGGTCCCATATCT

79.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G19386A*

25 AAGGAGATTGATGCAGTTTTGCCCA
AAGGAGATTGATACAGTTTTGCCCA
30 TGGGCAAACCTGCATCAATCTCCTT
TGGGCAAACCTGTATCAATCTCCTT

80.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) T29753C*

40 TTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAA
TTGGCATGAGGTCTGCTCTCATGAA
45 TTCATGAGAGCAAACCTCATGCCAA
TTCATGAGAGCAGACCTCATGCCAA

81.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G6986A*

50
55 TTTTGTCTTTCAGTATCTCTTCCCT
TTTTGTCTTTCATATCTCTTCCCT
AGGGAAGAGATACTGAAAGACAAAA
60 AGGGAAGAGATATTGAAAGACAAAA

65

ES 2 356 458 A1

82.- *Transportador de serotonina (SLC6A4) promoter 44bp deletion*

5 ATCCCCCCTGCACCCCCCAGCATCC
ATCCCCCCTGCACCCCCCAGCATCCC
GGATGCTGGGGGGTGCAGGGGGGAT
10 GGGATGCTGGGGGGTGCAGGGGGGAT

83.- *Glutation S-transferasa M3 (GSTM3) delAGA (alelo*B)*

15 AGGGAAAAGAAGAGGATACTTCTCT
AGGGAAAAGAAGATACTTCTCTATC
20 AGAGAAGTATCCTCTTCTTTTCCCT
GATAGAGAAGTATCTTCTTTTCCCT

25 84.- *Glutation S-transferasa M1 (GSTM1) alelo nulo*

CACACATTCTTGGCCTTCTGCAGAT
CACACATTCTTGCCTTCTGCAGAT
30 ATCTGCAGAAGGCCAAGAATGTGTG
ATCTGCAGAAGGTCAAGAATGTGTG

35 85.- *Glutation S-transferasa n1 (GSTT1) alelo nulo*

40 CTGCCTAGTGGGTTACCTGCCCAC
CTGCCTAGTGGGGTACCTGCCCAC
GTGGGCAGGTGAACCCACTAGGCAG
45 GTGGGCAGGTGACCCCACTAGGCAG

86.- *Apolipoproteina E (APOE) Arg158Cys*

50 GACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGT
ACACTGCCAGGCGCTTCTGCAGGTC
GACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGT
55 ACACTGCCAGGCACTTCTGCAGGTC

87.- *Apolipoproteina E (APOE) Cys112Arg*

60 ATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGG
CCAGGCGGCCGCGCACGTCCTCCAT
65 ATGGAGGACGTGCGGCCGCCTGG
CCAGGCGGCCGCGCACGTCCTCCAT

88.- *Tumor necrosis factor (TNF) G-308A*

5 TTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCA
 TTGAGGGGCATGAGGACGGGGTTCA
 TGAACCCCGTCCCATGCCCCTCAA
 10 TGAACCCCGTCCTCATGCCCCTCAA

89.- *Interleucina 10 (IL10) G-1082A*

15 GCTTCTTTGGGAAGGGGAAGTAGGG
 GCTTCTTTGGGAGGGGAAGTAGGG
 20 CCCTACTTCCCCTTCCCAAAGAAGC
 CCCTACTTCCCCTTCCCAAAGAAGC

25 1.2 *Producción del DNA-chip para el genotipado de variaciones génicas asociadas a reacciones adversas a fármacos*

1.2.1 *Impresión de los portaobjetos de vidrio*

30 Se imprimen o depositan las sondas capaces de detectar las variaciones génicas de interés en un portaobjetos de vidrio aminosilanzado empleando DMSO como tampón de impresión. La impresión se lleva a cabo con un *spotter* o impresor de oligonucleótidos en el que se lleva a cabo un control de la temperatura y la humedad.

1.2.2 *Procesamiento de los portaobjetos de vidrio*

35 Las sondas capaces de detectar las distintas variaciones génicas identificadas previamente se imprimen en el soporte (portaobjetos de cristal) aminosilanzado empleando DMSO como tampón de impresión. La impresión se lleva a cabo con un *spotter* o impresor de oligonucleótidos (sondas) controlando la temperatura y la humedad relativa.

40 La unión de las sondas al soporte (portaobjetos de cristal) se lleva a cabo mediante entrecruzamiento con radiación ultravioleta y horneado tal y como se describe en la documentación aportada por el fabricante (Por ejemplo, Corning Lifesciences <http://www.corning.com>). La humedad relativa durante el proceso de deposición se mantiene entre el 40-50% y la temperatura en torno a 20°C.

45 1.3 *Validación de la utilidad clínica del DNA-chip para la detección simultánea, sensible, específica y reproducible de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos utilizando un DNA-chip*

1.3.1 *Preparación de la muestra a hibridar*

50 Se extrae DNA del individuo a partir de una muestra de sangre de 300 µl aproximadamente mediante un protocolo de filtración.

55 Se amplifican todos los exones e intrones de interés mediante PCR multiplex utilizando las parejas de oligonucleótidos cebadores apropiadas. Prácticamente puede utilizarse cualquier pareja de oligonucleótidos cebadores que permita la amplificación específica de fragmentos génicos en los que pueda existir la variación génica a detectar, ventajosamente, aquellas parejas que permitan dicha amplificación en el menor número posible de reacciones PCR.

60 Los oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar, mediante PCR multiplex, los fragmentos de los genes en los que pueden existir las variaciones génicas correspondientes asociadas a reacciones adversas a fármacos a detectar, se mencionan a continuación.

1.- *Receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) Arg389Gly* (oligonucleótidos para amplificar el fragmento en el que puede existir el polimorfismo Arg389Gly en el gen del receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1)

65 SEQ ID NO 1: GCCTTCAACCCCATCATCTA
 SEQ ID NO 2: CAGGCTCGAGTCGCTGTC

ES 2 356 458 A1

2.- *Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) Arg16Gly y Gln27Glu* (oligonucleótidos para amplificar el fragmento en el que puede existir el polimorfismo Arg16Gly en el gen del receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2))

5 **SEQ ID NO 3: GCTCACCTGCCAGACTGC**
 SEQ ID NO 4: GCCAGGACGATGAGAGACAT

10 *3.- Receptor dopaminérgico D3 (DRD3) Ser9Gly*

 SEQ ID NO 5: CGCAGTAGGAGAGGGCATAG
15 **SEQ ID NO 6: CAAGCCCCAAAGAGTCTGAT**

20 *4.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) His452Tyr*

 SEQ ID NO 7: AGCAAGATGCCAAGACAACA
 SEQ ID NO 8: CAGTGTGCCTTCCACAGTTG
25

30 *5.- Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) T102C*

 SEQ ID NO 9: AGGAGAGACACGACGGTGAG
 SEQ ID NO 10: CAAGTTCTGGCTTAGACATGGA

35 *6.- Catecol-O-metiltransferasa (COMT) Val108Met*

 SEQ ID NO 11: GGGCCTACTGTGGCTACTCA
40 **SEQ ID NO 12: CCCTTTTCCAGGTCTGACA**

45 *7.- Glutation S transferasa clase I (GSTP1) Ile105Val*

 SEQ ID NO 13: TGGTGGACATGGTGAATGAC
 SEQ ID NO 14: GTGCAGGTTGTGTCTTGTCC
50

55 *8.- Aducina I (ADD1) Gly460Trp*

 SEQ ID NO 15: TTGCTAGTGACGGTGATTTCG
 SEQ ID NO 16: GAGACTGCAGCAAGGGTTTC

60 *9.- Proteína de reparación de DNA XRCC1 Arg399Gln*

 SEQ ID NO 17: TGTCTCCCCTGTCTCATTCC
 SEQ ID NO 18: ATTGCCAGCACAGGATAAG
65

ES 2 356 458 A1

10.- *Citocromo P450 1A1 (CYP1A1) Ile462Val*

SEQ ID NO 19: CTCACCCCTGATGGTGCTAT

SEQ ID NO 20: TTTGGAAGTGCTCACAGCAG

11.- *Receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) A1166C*

SEQ ID NO 21: GAGAACATTCCTCTGCAGCAC

SEQ ID NO 22: TGTGGCTTTGCTTTGTCTTG

12.- *Receptor B2 de bradikina (BDKRB2) C-58T*

SEQ ID NO 23: GAGCAATGTCTGGCTTCTCC

SEQ ID NO 24: CCAGGGAGAGAACATTTGGA

13.- *Angiotensinógeno (AGT) Met235Thr*

SEQ ID NO 25: AGGCTGTGACAGGATGGAAG

SEQ ID NO 26: GGTGGTCACCAGGTATGTCC

14.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) C430T*

SEQ ID NO 27: CCTGGGATCTCCCTCCTAGT

SEQ ID NO 28: CCACCCTTGGTTTTTCTCAA

15.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) A1075C, T1076C y C1080G*

SEQ ID NO 29: CCACATGCCCTACACAGATG

SEQ ID NO 30: TCGAAAACATGGAGTTGCAG

16.- *Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) 818delA*

SEQ ID NO 31: CCGGGAACCTACAACAAATTA

SEQ ID NO 32: CACAAATTCACAAGCAGTCACA

17.- *Citocromo P450 2D6 31G>A, 100C>T y 138insT*

SEQ ID NO 33: CAGGTATGGGGCTAGAAGCA

SEQ ID NO 34: ACCTGGTCGAAGCAGTATGG

ES 2 356 458 A1

18.- *Citocromo P450 2D6 883G>C, 1023C>T, 1039C>T*

SEQ ID NO 35: GATCCTGGCTTGACAAGAGG

SEQ ID NO 36: TCCCACGGAAATCTGTCTCT

19.- *Citocromo P450 2D6 1659G>A, 1661G>C, 1707T>del, 1758G>Ay 1758G>T*

SEQ ID NO 37: GTGGGGCTAATGCCTTCAT

SEQ ID NO 38: CTTCCCAGTTCCCGCTTT

20.- *Citocromo P450 2D6 1846G>A y 1863ins9bp*

SEQ ID NO 39: GTGGGTGATGGGCAGAAG

SEQ ID NO 40: GAGGGTCGTCGTACTIONCGAAG

21.- *Citocromo P450 2D6 1973insG*

SEQ ID NO 41: AGCCGTGAGCAACGTGAT

SEQ ID NO 42: CTGCAGAGACTCCTCGGTCT

22.- *Citocromo P450 2D6 2539delAACT, 2549A>del, 2613delAGA*

SEQ ID NO 43: CAAGGTCCTACGCTTCCAAA

SEQ ID NO 44: GATGCACTGGTCCAACCTTT

23.- *Citocromo P450 2D6 2850C>T y 2935A>C*

SEQ ID NO 45: GGAACCCTGAGAGCAGCTT

SEQ ID NO 46: GGTGTCCCAGCAAAGTTCAT

24.- *Citocromo P450 2D6 3183G>A, 3198C>G y 3277T>C*

SEQ ID NO 47: GGAGGCAAGAAGGAGTGTCA

SEQ ID NO 48: CGATGTCACGGGATGTCATA

25.- *Citocromo P450 2D6 4042G>A y 4125insGTGCCCACT*

SEQ ID NO 49: GGAGTCTTGCAGGGGTATCA

SEQ ID NO 50: TCACCAGGAAAGCAAAGACA

ES 2 356 458 A1

26.- *Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) C792G y A805T*

SEQ ID NO 51: GAACACCAAGCATCACTGGA

SEQ ID NO 52: GATGTTTAGTGCAGGCCATA

27.- *Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) G416A*

SEQ ID NO 53: CTCACAACCTTGCGGAATTT

SEQ ID NO 54: CTTCAAATCTCCCTCCACCA

28.- *Citocromo P450 2C8 (CYP2C8) A1196G*

SEQ ID NO 55: ACCTGCTGAGAAAGGCATGA

SEQ ID NO 56: TTCCAGGGCACAACCATAAT

29.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) 191G>A y 282C>T*

SEQ ID NO 57: CCATGGAGTTGGGCTTAGAG

SEQ ID NO 58: CCATGCCAGTGCTGTATTTG

30.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) T341C*

SEQ ID NO 59: TGGTGTCTCCAGGTCAATCA

SEQ ID NO 60: GGCTGATCCTTCCCAGAAAT

31.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) C481T*

SEQ ID NO 61: TGACGGCAGGAATTACATTG

SEQ ID NO 62: TGTTTCTTCTTTGGCAGGAGA

32.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) A803G*

SEQ ID NO 63: ACTGTTTGGTGGGCTTCATC

SEQ ID NO 64: AGGTTTGGGCACGAGATTT

33.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G590A*

SEQ ID NO 65: CCTGCCAAAGAAGAAACACC

SEQ ID NO 66: GATGAAGCCCACCAAACAGT

ES 2 356 458 A1

34.- *N-acetiltransferasa 2 (NAT2) G857A*

SEQ ID NO 67: ACTGTTTGGTGGGCTTCATC

5 SEQ ID NO 68: GGGTGATACATACACAAGGGTTT

35.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G636A*

10

SEQ ID NO 69: ACCCTGTGATCCCACTTTCA

SEQ ID NO 70: TGTACTTCAGGGCTTGGTCA

15

36.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C680T y G681A*

20

SEQ ID NO 71: CAACCAGAGCTTGGCATATTG

SEQ ID NO 72: TAAAGTCCCGAGGGTTGTTG

25

37.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) A1G*

SEQ ID NO 73: TAGTGGGCCTAGGTGATTGG

30

SEQ ID NO 74: TTTCCAATCACTGGGAGAGG

38.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) IVS5+2T>A*

35

SEQ ID NO 75: CAACCCTCGGGACTTTATTG

SEQ ID NO 76: CAAGCATTACTCCTTGACCTGTT

40

39.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) T358C*

45

SEQ ID NO 77: CCCAGTGTCAGCTTCCTCTT

SEQ ID NO 78: GTCCTCAATGCTCCTCTTCC

50

40.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) G431A*

SEQ ID NO 79: GAATCGTTTTTCAGCAATGGAA

55

SEQ ID NO 80: GTATGTTACCCACCCTTGG

41.- *Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) C1297T*

60

SEQ ID NO 81: TCACCGAACAGTTCTTGCAT

SEQ ID NO 82: GTCAAGGTCCTTTGGGTCAA

65

ES 2 356 458 A1

42.- *Receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B) C2664T*

5 SEQ ID NO 83: GCAGGATGTTGGAGTGTGTG

SEQ ID NO 84: GCAATTATTGGTGGGAGAGTG

10 43.- *Glicoproteína P (ABCB1) C3435T*

SEQ ID NO 85: TGCTCCCAGGCTGTTTATTT

SEQ ID NO 86: TGTTCAGCTGCTTGATGG

15 44.- *Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) A719G*

20 SEQ ID NO 87: GGTTGATGCTTTTGAAGAACG

SEQ ID NO 88: CATCCATTACATTTTCAGGCTTT

25 45.- *Tiopurinmetiltransferasa (TPMT) G238C*

SEQ ID NO 89: AAAACTTTTGTGGGGATATGGA

SEQ ID NO 90: AACCCCTCTATTTAGTCATTTGAAAACA

30 46.- *5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T*

35 SEQ ID NO 91: TCCCTGTGGTCTCTTCATCC

SEQ ID NO 92: CAAAGCGGAAGAATGTGTCA

40 47.- *Butirilcolinesterasa (BCHE) Asp70Gly*

45 SEQ ID NO 93: AAAGCCACAGTCTCTGACCAA

SEQ ID NO 94: GGTGCTGGAATCCATACATTT

50 48.- *Butirilcolinesterasa (BCHE) Ala539Thr*

SEQ ID NO 95: GAGAAAATGGCTTTTGTATTTCG

SEQ ID NO 96: TGATTTTCCAGTCCATCATGT

55 49.- *Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) A-392G*

60 SEQ ID NO 97: CAGGGGAGGAAATGGTTACA

SEQ ID NO 98: TGGAGCCATTGGCATAAAAT

65

ES 2 356 458 A1

50.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-163C*

SEQ ID NO 99: AGAGAGCCAGCGTTCATGTT

5 SEQ ID NO 100: CTGATGCGTGTCTGTGCTT

51.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) A-3860G*

10 SEQ ID NO 101: GAGTGCAGTGGTGCGATCT

15 SEQ ID NO 102: TGAGGCCAGGAGTTCAAGAC

52.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) G3534A*

20 SEQ ID NO 103: GGTGGAGGTAGGAGCAACAC

SEQ ID NO 104: CTGCTGAACCTGCACACATT

53.- *Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) C558A*

25 SEQ ID NO 105: CCTCATCCTCCTGCTACCTG

30 SEQ ID NO 106: GAGGCAGTCTCCACGAACTC

54.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G14690A*

35 SEQ ID NO 107: GCCTACAGCATGGATGTGA

SEQ ID NO 108: TGGAATTGTACCTTTTAAGTGGA

55.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) C3699T*

40 SEQ ID NO 109: TCACAATCCCTGTGACCTGA

45 SEQ ID NO 110: GGGGCATTTTTACTGATGGA

56.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G19386A*

50 SEQ ID NO 111: TGAAACCACCAGCAGTG TTC

SEQ ID NO 112: AAAATTCTCCTGGGGAGTGG

57.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) T29753C*

55 SEQ ID NO 113: ACCCCTAACATGTA ACTCTGTGG

60 SEQ ID NO 114: TTTGAAGGAGAAGTTCTGAAGGA

65

ES 2 356 458 A1

58.- *Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) G6986A*

SEQ ID NO 115: CACCCAGCTTAACGAATGCT

SEQ ID NO 116: CCAGGAAGCCAGACTTTGAT

59.- *Transportador de serotonina (SLC6A4) promoter 44bp deletion*

SEQ ID NO 117: ACCCCTAATGTCCCTACTGC

SEQ ID NO 118: GGAGATCCTGGGAGAGGTG

60.- *Glutation S-transferasa M3 (GSTM3) delAGA (alelo*B)*

SEQ ID NO 119: TTCTGGGGAAATTCTCATGG

SEQ ID NO 120: TCAGGTTTGGGAACATCC

61.- *Glutation S-transferasa M1 (GSTM1) alelo nulo*

SEQ ID NO 121: ATGGTTTGCAGGAAACAAGG

SEQ ID NO 122: AAAGCGGGAGATGAAGTCCT

62.- *Glutation S-transferasa n1 (GSTT1) alelo nulo*

SEQ ID NO 123: GGCAGCATAAGCAGGACTTC

SEQ ID NO 124: GTTGCTCGAGGACAAGTTCC

63.- *Apolipoproteina E (APOE) Arg158Cys y Cys112Arg*

SEQ ID NO 125: GCACGGCTGTCCAAGGA

SEQ ID NO 126: GCGGGCCCCGGCCTGGT

64.- *Tumor necrosis factor (TNF) G-308A*

SEQ ID NO 127: ACCTGGTCCCCAAAAGAAAT

SEQ ID NO 128: AAAGTTGGGGACACACAAGC

65.- *Interleucina 10 (IL10) G-1082A*

SEQ ID NO 129: CACACACACACACAAATCCAAG

SEQ ID NO 130: GATGGGGTGGGAAGAAGTTGA

Las PCR multiplex se llevan a cabo simultáneamente bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura que permiten la amplificación específica de los fragmentos de los genes en los que pueda existir la variación génica a detectar. Finalizada la PCR multiplex se comprueba, en gel de agarosa, que ha tenido lugar reacción de amplificación.

ES 2 356 458 A1

A continuación, la muestra a hibridar (producto de la amplificación) se somete a fragmentación con una Dnasa y los productos resultantes del proceso de fragmentación se someten a una reacción de mareaje indirecto. Una transferasa terminal incorpora un nucleótido unido a un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, biotina, al final de estos pequeños fragmentos.

5 Antes de aplicar la muestra sobre el DNA-chip se procede a desnaturalizar la muestra mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos y, posteriormente, se añade el tampón de hibridación "ChipMap hybridisation Kit Buffers" (Ventana Medical System).

10 A continuación se procede a realizar las etapas de hibridación, escaneado del portaobjetos, cuantificación de la imagen e interpretación de los resultados, siguiendo el procedimiento descrito en los siguientes apartados:

A. Hibridación

15 La hibridación se lleva a cabo de forma automática en la estación de hibridación Ventana Discovery (Ventana Medical Systems), desarrollada para tal fin.

Se realiza una prehibridación o bloqueo del portaobjetos con BSA. A continuación, se aplica la muestra junto con la solución de hibridación [ChipMap Kit Hybridization Buffer (Ventana Medical System)] y se mantiene durante 20 1 hora a 45°C siguiendo el protocolo Ventana 9.0 Europe (Ventana Medical System). Finalmente, el portaobjetos se somete a la acción de diferentes soluciones de lavado [ChipMap hybridisation Kit Buffers (Ventana Medical System)]. Una vez finalizado el proceso de hibridación se procede al lavado final y secado del portaobjetos.

25 Finalizada la hibridación, el revelado con estreptavidina-Cy3 marca los puntos (sondas) en los que se ha producido la hibridación.

B. Escaneado del portaobjetos

30 Se introduce el portaobjetos en el escáner de fluorescencia confocal, por ejemplo Axon escáner 4100A, y se procede a escanear la señal emitida por el mareaje estándar al ser excitado por el láser.

C. Cuantificación de la imagen

35 El software del propio escáner permite la cuantificación en la imagen obtenida de la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.

40 D. Interpretación de los resultados

A partir de la señal que se obtiene con las sondas que detectan las diferentes variaciones génicas se establece el genotipo del individuo. Para ello, brevemente, en primer lugar, a los valores absolutos de intensidad de todas las sondas se les resta su propio ruido de fondo; a continuación, se agrupan las réplicas correspondientes a cada uno de 45 las 4 sondas que se usan para caracterizar cada variación génica. El valor medio de intensidad para cada una de las 4 sondas se calcula usando la media acotada de las réplicas para eliminar los puntos aberrantes. Conocidos los valores medios de intensidad para cada una de las sondas se calculan dos ratios (ratio 1 y ratio 2):

50

Intensidad media sonda 1

Ratio 1 = -----

55

Intensidad media sonda 1 + Intensidad media sonda 2

60

Intensidad media sonda 3

Ratio 2 = -----

65

Intensidad media sonda 3 + Intensidad media sonda 4

ES 2 356 458 A1

Estos ratios se sustituyen en tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles:

AA Función 1

5 AB Función 2

BB Función 3

10 La función que presente un valor absoluto mayor determina el genotipo que presenta el paciente.

15 En este caso, la obtención de dichas funciones lineales se lleva a cabo mediante el análisis de 5 sujetos por cada uno de los tres posibles genotipos de la variación génica (AA, AB, BB). Con los resultados, se calculan los ratios 1 y 2 para los 15 sujetos. Estos ratios sirven como variables de clasificación de los tres grupos para generar las funciones lineales. Con estas tres funciones lineales se evalúa la capacidad discriminatoria de las dos parejas de sondas diseñadas. En caso de que la capacidad de discriminación no sea del 100%, las sondas serían rediseñadas. Nuevos sujetos caracterizados para cada uno de los tres genotipos constituyen nuevos ratios 1 y 2 para perfeccionar las combinaciones lineales de los mismos que constituyen las funciones lineales y, en definitiva, para mejorar la capacidad discriminatoria del algoritmo basado en estas tres funciones.

20 Siempre que los ratios 1 y 2 se encuentren dentro del rango de los ratios usados para construir los grupos, la intensidad de fluorescencia media de las 40 réplicas con respecto al ruido de fondo sea mayor de 5 y el coeficiente de variación de todas las réplicas del DNA-chip esté por debajo de 0,25 (utilizando un escáner de fluorescencia confocal) el resultado de las funciones lineales se considera correcto.

25 Para dar por buena una hibridación completa es necesario que la relación intensidad frente a ruido de fondo de todas las sondas del DNA chip esté por encima de 15. Asimismo, la media de todos los ratios debe superar 0,6 como control de especificidad y sensibilidad. El ratio del control externo debe estar por encima de 0,6 y el control negativo nunca debe ser superior a 3 veces el ruido de fondo. Estos parámetros son consistentes con la realización particular de un escáner de fluorescencia confocal.

30 Resumiendo, cada mutación presenta en el portaobjetos 4 sondas (repetidas 10 veces) para su detección. Dos de dichas sondas detectan una variación génica y las otras dos la otra variación génica. La base interrogada se localiza siempre en la posición central.

35 En el caso de un sujeto homocigoto para la variación génica A, este no presentará variación génica B; por consiguiente, en la imagen que se obtiene del soporte de cristal las sondas que detectan la variación génica B presentan una señal de hibridación notablemente inferior a la presentada por la variación génica A y viceversa; en este caso, los ratios 1 y 2 tenderán a 1 y los sujetos serán asignados como homocigotos AA por el software de análisis.

40 Por otro lado, un sujeto heterocigoto para una variación génica determinada presenta ambas la variaciones génicas; por tanto, las sondas que los detectan presentan una señal de hibridación equivalente. Los ratios 1 y 2 tenderán a 0,5 y los sujetos serán asignados como heterocigotos AB por el software de análisis.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un DNA-chip de genotipado adecuado para la puesta en práctica de un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto asociadas a reacciones adversas a fármacos,

comprendiendo dicho método:

- extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;
- amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;
- someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;
- poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan 4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;
- introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y
- genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles,

comprendiendo dicho DNA-chip un soporte sobre el que están depositadas una pluralidad de sondas útiles para detectar variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes, en donde, por cada variación génica a detectar, hay 4 sondas, de las cuales 2 sondas detectan una primera variación génica y las otras 2 detectan una segunda variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas, depositadas siguiendo una patrón determinado y distribuidas homogéneamente entre las 2 áreas que constituyen el DNA-chip pero no agrupadas por variación génica a detectar, y, opcionalmente, unos oligonucleótidos depositados sobre el soporte útiles como controles positivos y negativos de las reacciones de hibridación, y

en el que dicho soporte comprende una pluralidad de sondas que permiten la detección de las variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos, en donde dichas variaciones génicas humanas relacionadas con reacciones adversas a fármacos se seleccionan del grupo formado por el polimorfismo Arg389Gly en el Receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1), los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu en el Receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2), el polimorfismo Ser9Gly del Receptor dopaminérgico D3 (DRD3), los polimorfismos His452Tyr y T102C del Receptor serotoninérgico 2A (HTR2A), el polimorfismo Val108Met de Catecol-O-metiltransferasa (COMT), el polimorfismo Ile105Val de Glutathion S transferasa clase 1 (GSTP1), el polimorfismo Gly460Trp de Aducina 1 (ADD1), el polimorfismo Arg399Gln de la Proteína de reparación de DNA XRCC1, el polimorfismo Ile462Val del citocromo P450 1A1 (CYP1A1), el polimorfismos A1166C del Receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1), el polimorfismo C-58T del receptor B2 de bradikinina (BDKRB2), el polimorfismo Met235Thr de Angiotensinógeno (AGT), los polimorfismos C430T, A1075C, 818delA, T1076C y C1080G del citocromo P450 2C9 (CYP2C9), los polimorfismos H324P, V136V, V11M, C882G, C1038T, G4180C, A1847G, C-1584G, C100T, 138insT, C1023T, G1659A, 1707T/del, G1758A/T, 1863ins9bp, 1973insG, 2539delAACT, 2549A/del, 2613delAGA, C2850T, G3183A, C3198G, T3277C, G4042A y 4125insGTGCCCACT del citocromo P450 2D6 (CYP2D6), los polimorfismos A805T, G416A, A1196G, C792G, del citocromo P450 2C8 (CYP2C8), los polimorfismos T341C, C481T, A803G, C282T, G590A, G857A y G191A, de N-acetiltransferasa 2 (NAT2), los polimorfismos G636A, G681A, C680T, A1G, IVS5+2T>A, T358C, G431A y C1297T del citocromo P450 2C19 (CYP2C19), el polimorfismo C2664T del receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) 2B (GRIN2B), el polimorfismo C3435T de la glicoproteína P (ABCB1), los polimorfismos A719G y G238C de Tiopurinmetiltransferasa (TPMT), el polimorfismo C677T de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (TPMT), los polimorfismos Asp70Gly y Ala539Thr de Butirilcolinesterasa (BCHE), el polimorfismo A-392G del citocromo P450 3A4 (CYP3A4), los polimorfismos A-163C, A-3860G, G3534A y C558A del citocromo P450 1A2 (CYP1A2), los polimorfismos G14690A, C3699T, G19386A, T29753C y G6986A del citocromo P450 3A5

ES 2 356 458 A1

(CYP3A5), el polimorfismo 44bp deleción del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4), el polimorfismo delAGA (alelo*B) de Glutation S-transferasa M3 (GSTM3), el polimorfismo alelo nulo de Glutation S-transferasa M1 (GSTM1), el polimorfismo alelo nulo de Glutation S-transferasa n1 (GSTT1), los polimorfismos Cys112Arg y Arg158Cys de apolipoproteína E (APOE), el polimorfismo G-308A de Tumor necrosis factor (TNF), el polimorfismo G-1082A de Interleucina 10 (IL10) y combinaciones de los mismos.

2. DNA-chip según la reivindicación 1, en el que cada una de dichas 4 sondas para la detección de cada variación génica presentan la base a interrogar en la posición central y tiene una longitud comprendida entre 19 y 27 nucleótidos.

3. Uso de un DNA-chip según la reivindicación 1 ó 2 para el genotipado simultáneo, sensible, específico y reproducible de múltiples variaciones génicas humanas asociadas con reacciones adversas a fármacos.

4. Un kit adecuado para la puesta en práctica de un método *in vitro*, extracorpóreo, para el genotipado simultáneo de múltiples variaciones génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto asociadas a reacciones adversas a fármacos que comprende:

- un DNA-chip según la reivindicación 1 ó 2;
 - un protocolo de detección de dichas variaciones génicas, basado en el método que comprende:
 - a) extraer el ácido nucleico de una muestra biológica procedente de un sujeto;
 - b) amplificar regiones de dicho ácido nucleico que contienen las variaciones génicas a identificar, y, opcionalmente, marcar dichos productos de amplificación durante la reacción de amplificación, para obtener unos productos de amplificación, opcionalmente marcados, que contienen las variaciones génicas a identificar;
 - c) someter dichos productos de amplificación a una reacción de fragmentación para obtener unos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar, y, en caso de que dichos productos de amplificación no hubieran sido marcados previamente en la etapa de amplificación, marcar dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar;
 - d) poner en contacto dichos productos de fragmentación que contienen las variaciones génicas a identificar con sondas capaces de identificar mediante hibridación las variaciones génicas correspondientes, bajo condiciones que permiten la hibridación de dichos productos de fragmentación con dichas sondas, en donde dichas sondas están depositadas en un soporte y, por cada variación génica a caracterizar, se usan 4 sondas que se depositan en dicho soporte siguiendo un patrón determinado de forma que se hallen homogéneamente distribuidas pero no agrupadas por variación génica a caracterizar, de las cuales 2 sondas detectan una variación génica y las otras 2 sondas detectan otra variación génica, en donde el número de réplicas de cada una de dichas sondas es de 10, 8 ó 6 réplicas;
 - e) introducir, tras la hibridación, dicho soporte en un escáner y cuantificar la intensidad de los puntos en donde se ha producido la hibridación; y
 - f) genotipar cada una de las variaciones génicas a partir de la media acotada de las intensidades de las 10, 8 ó 6 réplicas de cada una de las 4 sondas, en la que se eliminan los valores extremos, mediante la aplicación de un algoritmo que permite detectar cada una de las variaciones génicas con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad tales que permiten la aplicación clínica del método, en base a que conduce a la obtención de tres funciones lineales que caracterizan a cada uno de los tres genotipos posibles,
- y, opcionalmente,
- un software informático que facilita, automatiza y asegura la reproducibilidad de la aplicación de dicho algoritmo para la interpretación de los datos generados con la aplicación de dicho método.

5. Uso de un kit según la reivindicación 4 para la predicción *in vitro* de la respuesta a tratamientos farmacológicos o para la detección *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos.

6. Un oligonucleótido seleccionado del grupo de oligonucleótidos identificados en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 130.

ES 2 356 458 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Progenika Biopharma, S.A.
- 5 <120> Métodos y productos para genotipado *in vitro* de variaciones génicas humanas asociadas a reacciones adversas a fármacos
- <160> 130
- 10 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- 20 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) en el que puede existir el polimorfismo Arg389Gly
- <400> 1
- 25 gccttcaacc ccatcatcta 20
- <210> 2
<211> 18
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- 35 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 1 (ADRB1) en el que puede existir el polimorfismo Arg389Gly
- <400> 2
- 40 caggctcgag tcgctgtc 18
- <210> 3
- 45 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220> ADN sintético
- <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) en el que puede existir el polimorfismo Arg16Gly y Gln27Glu
- 55 <400> 3
- gctcacctgc cagactgc 18
- 60 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220> ADN sintético

ES 2 356 458 A1

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) en el que puede existir el polimorfismo Arg16Gly y Gln27Glu

5 <400> 4
gccaggacga tgagagacat 20

<210> 5
10 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor dopaminérgico D3 (DRD3) en el que puede existir el polimorfismo Ser9Gly

20 <400> 5
cgcagtagga gagggcatag 20

25 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor dopaminérgico D3 (DRD3) en el que puede existir el polimorfismo Ser9Gly

35 <400> 6
caagcccaaa agagtctgat 20

40 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el polimorfismo His452Tyr

50 <400> 7
agcaagatgc caagacaaca 20

55 <210> 8
<211> 20
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el polimorfismo His452Tyr

ES 2 356 458 A1

<400> 8
cagtgtcct tccacagttg 20

5 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el
15 polimorfismo T102C

<400> 9
aggagagaca cgacggtgag 20

<210> 10
<211> 22
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor serotoninérgico 2A (HTR2A) en el que puede existir el
polimorfismo T102C

<400> 10
35 caagttctgg ctagacatg ga 22

<210> 11
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen catecol-O-metiltransferasa (COMT) en el que puede existir el
polimorfismo Val108Met

50 <400> 11
gggctactg tggtactca 20

55 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen catecol-O-metiltransferasa (COMT) en el que puede existir el
polimorfismo Val108Met

65

ES 2 356 458 A1

<400> 12
cccttttcc aggtctgaca 20

5
<210> 13
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutation S transferasa clase 1 (GSTP1) en el que puede existir el
15 polimorfismo Ile105Val

<400> 13
20 tggaggacat ggtgaatgac 20

<210> 14
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutation S transferasa clase 1 (GSTP1) en el que puede existir el
polimorfismo Ile105Val

<400> 14
35 gtcaggttg tgtctgtcc 20

<210> 15
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen aducina 1 (ADD1) en el que puede existir el polimorfismo
Gly460Trp

50 <400> 15
ttgctagtga cggatgacg 20

55 <210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen aducina 1 (ADD1) en el que puede existir el polimorfismo
Gly460Trp

65

ES 2 356 458 A1

<400> 16
gagactgcag caagggttc 20

5
<210> 17
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen de la proteína de reparación de DNA XRCC1 en el que puede
15 existir el polimorfismo Arg399Gln

<400> 17
tgtctcccct gtctcattcc 20

<210> 18
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen de la proteína de reparación de DNA XRCC1 en el que puede
existir el polimorfismo Arg399Gln

<400> 18
35 attgccccagc acaggataag 20

<210> 19
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A1 (CYP1A1) en el que puede existir el poli-
morfismo Ile462Val

50 <400> 19
ctcaccctg atggtgctat 20

55 <210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A1 (CYP1A1) en el que puede existir el poli-
morfismo Ile462Val

65

ES 2 356 458 A1

<400> 20
tttgaagtg ctcacagcag 20

5
<210> 21
<211> 21
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) en el que puede existir el polimorfismo A1166C
15

<400> 21
gagaacattc ctctgcagca c 21

<210> 22
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1) en el que puede existir el polimorfismo A1166C

<400> 22
35 tgtggctttg cttgtcttg 20

<210> 23
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor B2 de bradikina (BDKRB2) en el que puede existir el polimorfismo C-58T
45

<400> 23
50 gagcaatgtc tgctctcc 20

<210> 24
55 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor B2 de bradikina (BDKRB2) en el que puede existir el polimorfismo C-58T
65

ES 2 356 458 A1

<400> 24
ccaggagag aacattgga 20

5 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen angiotensinógeno (AGT) en el que puede existir el polimorfismo
15 Met235Thr

<400> 25
20 aggctgtgac aggatggaag 20

<210> 26
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen angiotensinógeno (AGT) en el que puede existir el polimorfismo
Met235Thr

<400> 26
35 ggtggtcacc aggtatgtcc 20

<210> 27
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que puede existir el poli-
morfismo C430T

50 <400> 27
cctgggatct cctcctagt 20

55 <210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que puede existir el poli-
morfismo C430T

65

ES 2 356 458 A1

<400> 28
ccacccttgg ttttctcaa 20

5 <210> 29
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que pueden existir los
15 polimorfismos A1075C, T1076C y C1080G

<400> 29
ccacatgccc tacacagatg 20

20 <210> 30
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que pueden existir los
polimorfismos A1075C, T1076C y C1080G

<400> 30
35 tcgaaaacat ggagttgcag 20

<210> 31
40 <211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que puede existir el polimorfismo 812delA

<400> 31
50 ccgggaactc acaacaaatt a 21

<210> 32
55 <211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el gen citocromo P450 2C9 (CYP2C9) en el que puede existir el polimorfismo 812delA

<400> 32
65 cacaaattca caagcagtca ca 22

ES 2 356 458 A1

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
5 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
10 31G>A, 100C>T y 138insT

<400> 33
15 caggtatggg gctagaagca 20

<210> 34
<211> 20
20 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
25 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
31G>A, 100C>T y 138insT

<400> 34
30 acctggtcga agcagtatgg 20

<210> 35
35 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
40 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
883G>C, 1023C>T y 1039C>T

<400> 35
45 gatcctggct tgacaagagg 20

<210> 36
50 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
55 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
883G>C, 1023C>T y 1039C>T

<400> 36
60 tcccacggaa atctgtctct 20

<210> 37
65 <211> 19

ES 2 356 458 A1

<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 1659G>A, 1661G>C, 1707T>del, 1758G>A y 1758G>T

10 <400> 37
gtggggctaa tgccttcat 19

15 <210> 38
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 1659G>A, 1661G>C, 1707T>del, 1758G>A y 1758G>T

25 <400> 38
cttcccagtt cccgcttt 18

30 <210> 39
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

35 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir los polimorfismos 1846G>A y 1863ins9bp

40 <400> 39
gtgggtgatg ggcagaag 18

45 <210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

50 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir los polimorfismos 1846G>A y 1863ins9bp

55 <400> 40
gagggtcgtc gtactcgaag 20

60 <210> 41
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

65

ES 2 356 458 A1

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir el polimorfismo 1973insG

5 <400> 41
agccgtgagc aacgtgat 18

10 <210> 42
<211> 20
<212> ADN
15 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que puede existir el polimorfismo 1973insG

20 <400> 42
ctgcagagac tcctcggctc 20

25 <210> 43
<211> 20
<212> ADN
30 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
35 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 para detectar los polimorfismos 2539delAACT, 2549A>del y 2613delAGA

<400> 43
40 caaggtccta cgcttcaaaa 20

<210> 44
<211> 20
45 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
50 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 para detectar los polimorfismos 2539delAACT, 2549A>del y 2613delAGA

<400> 44
55 gatgcactgg tccaaccttt 20

<210> 45
60 <211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

65 <220> ADN sintético

ES 2 356 458 A1

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 2850C>T y 2935A>C

5 <400> 45
ggaaccctga gaggcagctt 19

<210> 46
10 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 2850C>T y 2935A>C

20 <400> 46
ggtgtcccag caaagttcat 20

25 <210> 47
<211> 20
<212> ADN
30 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 3183G>A, 3198C>G y 3277T>C

35 <400> 47
ggaggcaaga aggagtgtca 20

40 <210> 48
<211> 20
<212> ADN
45 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 3183G>A, 3198C>G y 3277T>C

50 <400> 48
cgatgtcacg ggatgtcata 20

55 <210> 49
<211> 20
60 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
65 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos 4042G>A y 4125insGTGCCCACT

ES 2 356 458 A1

<400> 49
ggagtcttgc aggggtatca 20

5 <210> 50
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2D6 en el que pueden existir los polimorfismos
15 4042G>A y 4125insGTGCCCACT

<400> 50
tcaccaggaa agcaaagaca 20

<210> 51
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que pueden existir los
polimorfismos C792G y A805T

<400> 51
35 gaacaccaag catcactgga 20

<210> 52
40 <211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que pueden existir los
45 polimorfismos C792G y A805T

<400> 52
50 gatgtttagt gcaggcccat a 21

<210> 53
55 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el poli-
65 morfismo G416A

ES 2 356 458 A1

<400> 53
ctcacaacct tgcggaattt 20

5 <210> 54
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el poli-
15 morfismo G416A

<400> 54
cttcaaatct ccctccacca 20

<210> 55
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el poli-
morfismo A1196G

<400> 55
35 acctgctgag aaaggcatga 20

<210> 56
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C8 (CYP2C8) en el que puede existir el poli-
45 morfismo A1196G

<400> 56
50 ttccagggca caaccataat 20

<210> 57
55 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que pueden existir los polimor-
65 fismos 191G>A y 282C>T

ES 2 356 458 A1

<400> 57

ccatggagtt gggcttagag

20

5

<210> 58

<211> 20

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que pueden existir los polimorfismos 191G>A y 282C>T

<400> 58

ccatgccagt gctgtatttg

20

20

<210> 59

<211> 20

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo T341C

<400> 59

tggtgtctcc aggtcaatca

20

35

<210> 60

40 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético

<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo T341C

50 <400> 60

ggctgacct tcccagaaat

20

55 <210> 61

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

60

<220> ADN sintético

<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo C481T

65

ES 2 356 458 A1

	<400> 61	
	tgacggcagg aattacattg	20
5	<210> 62	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo C481T	
	<400> 62	
20	tgtttcttct ttggcaggag a	21
	<210> 63	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo A803G	
	<400> 63	
35	actgtttggt gggcttcac	20
	<210> 64	
40	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo A803G	
50	<400> 64	
	aggtttgggc acgagattt	19
55	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G590A	
65		

ES 2 356 458 A1

<400> 65
cctgccaaag aagaacacc 20

5 <210> 66
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G590A
15

<400> 66
gatgaagccc accaaacagt 20

20 <210> 67
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G857A

<400> 67
35 actgtttggt gggcttcac 20

<210> 68
40 <211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen n-acetiltransferasa 2 (NAT2) en el que puede existir el polimorfismo G857A

50 <400> 68
gggtgataca tacacaaggg tt 23

55 <210> 69
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el polimorfismo G636A
65

ES 2 356 458 A1

<400> 69
accctgtgat cccactttca 20

5
<210> 70
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
15 polimorfismo G636A

<400> 70
20 tgtacttcag ggcttggtca 20

<210> 71
<211> 21
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que pueden existir los
polimorfismos C680T Y G681A

<400> 71
35 caaccagagc ttggcatatt g 21

<210> 72
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que pueden existir los
polimorfismos C680T Y G681A

50 <400> 72
taaagtcccg agggttgttg 20

55 <210> 73
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo A1G

65

ES 2 356 458 A1

<400> 73
tagtgggcct aggtgattgg 20

5
<210> 74
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
15 polimorfismo A1G

<400> 74
ttccaatca ctgggagagg 20

<210> 75
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo IVS5+2T>A

<400> 75
35 caaccctcgg gactttattg 20

<210> 76
40 <211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo IVS5+2T>A

50 <400> 76
caagcattac tccttgacct gtt 23

55 <210> 77
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo T358C

65

ES 2 356 458 A1

<400> 77
cccagtgca gcttctctt 20

5
<210> 78
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
15 polimorfismo T358C

<400> 78
gtctctcaatg ctctcttcc 20

<210> 79
<211> 21
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
polimorfismo G431A

<400> 79
35 gaatcgtttt cagcaatgga a 21

<210> 80
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
45 polimorfismo G431A

<400> 80
50 gtatgttcac ccacccttg 20

<210> 81
55 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
65 polimorfismo C1297T

ES 2 356 458 A1

<400> 81
tcaccgaaca gttcttgcac 20

5 <210> 82
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 2C19 (CYP2C19) en el que puede existir el
15 polimorfismo C1297T

<400> 82
gtcaaggtcc ttgggtcaa 20

<210> 83
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato
(NMDA) 2B (GRIN2B) en el que puede existir el polimorfismo C2664T

<400> 83
35 gcaggatggt ggagtgtgtg 20

<210> 84
40 <211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen receptor de glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato
(NMDA) 2B (GRIN2B) en el que puede existir el polimorfismo C2664T

50 <400> 84
gcaattattg gtgggagagt g 21

55 <210> 85
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glicoproteína P (ABCB1) en el que puede existir el polimorfismo
65 C3435T

ES 2 356 458 A1

<400> 85
tgctcccagg ctgtttattt 20

5
<210> 86
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glicoproteína P (ABCB1) en el que puede existir el polimorfismo C3435T
15

<400> 86
tgttttcagc tgcttgatgg 20

<210> 87
<211> 21
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo A719G

<400> 87
35 ggttgatgct ttgaagaac g 21

<210> 88
40 <211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo A719G
45

<400> 88
50 catccattac atttcagge tt 23

<210> 89
55 <211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo G238C
65

ES 2 356 458 A1

<400> 89
aaaacttttg tggggatatg ga 22

5 <210> 90
<211> 27
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tiopurinmetiltransferasa (TPMT) en el que puede existir el polimorfismo G238C
15

<400> 90
aaccctctat ttagtcattt gaaaaca 27

20 <210> 91
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en el que puede existir el polimorfismo C677T

<400> 91
35 tccctgtggt ctcttcatcc 20

<210> 92
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en el que puede existir el polimorfismo C677T

50 <400> 92
caaagcggaa gaatgtgtca 20

55 <210> 93
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en que el puede existir el polimorfismo Asp70Gly
65

ES 2 356 458 A1

<400> 93
aaagccacag tctctgacca a 21

5
<210> 94
<211> 21
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en que el puede existir el polimorfis-
15 mo Asp70Gly

<400> 94
20 ggtgctggaa tccatacatt t 21

<210> 95
<211> 22
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en el que puede existir el polimorfis-
mo Ala539Thr

<400> 95
35 gagaaaatgg cttttgtatt cg 22

<210> 96
40 <211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen butirilcolinesterasa (BCHE) en el que puede existir el polimorfis-
mo Ala539Thr

50 <400> 96
tgatttttcc agtccatcat gt 22

55 <210> 97
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A4 (CYP3A4) en el que puede existir el poli-
65 morfismo A-392G

ES 2 356 458 A1

<400> 97
caggggagga aatggtaca 20

5 <210> 98
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A4 (CYP3A4) en el que puede existir el poli-
15 morfismo A-392G

<400> 98
tggagccatt ggcataaaat 20

<210> 99
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el poli-
morfismo A-163C

<400> 99
35 agagagccag cgttcattg 20

<210> 100
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el poli-
45 morfismo A-163C

<400> 100
50 ctgatgcgtg ttctgtgctt 20

<210> 101
55 <211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el poli-
morfismo A-3860G
65

ES 2 356 458 A1

	<400> 101	
	gagtgcagtg gtgcgatct	19
5	<210> 102	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo A-3860G	
	<400> 102	
20	tgaggccagg agttcaagac	20
	<210> 103	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo G3534A	
	<400> 103	
35	ggtggaggtg ggagcaaac	20
	<210> 104	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo G3534A	
50	<400> 104	
	ctgctgaacc tgcacacatt	20
55	<210> 105	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el polimorfismo C558A	
65		

ES 2 356 458 A1

<400> 105
cctcatcctc ctgctacctg 20

5 <210> 106
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2) en el que puede existir el poli-
15 morfismo C558A

<400> 106
gaggcagtct ccacgaactc 20

20 <210> 107
<211> 19
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
morfismo G14 690A

<400> 107
35 gcctacagca tggatgtga 19

<210> 108
40 <211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
morfismo G14 690A

50 <400> 108
tgggaattgta cctttaagt gga 23

55 <210> 109
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
morfismo C3699T

65

ES 2 356 458 A1

<400> 109
tcacaatccc tgtgacctga 20

5
<210> 110
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
15 morfismo C3699T

<400> 110
20 ggggcatttt tactgatgga 20

<210> 111
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
morfismo G19386A

<400> 111
35 tgaaccacc agcagtgttc 20

<210> 112
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
45 morfismo G19386A

<400> 112
50 aaaattctcc tggggagtgg 20

<210> 113
55 <211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
65 morfismo T29753C

ES 2 356 458 A1

<400> 113
accctaaca tgtaactctg tgg 23

5 <210> 114
<211> 23
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
15 morfismo T29753C

<400> 114
20 tttgaaggag aagtctgaa gga 23

<210> 115
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
morfismo G6986A

<400> 115
35 caccagctt aacgaatgct 20

<210> 116
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen citocromo P450 3A5 (CYP3A5) en el que puede existir el poli-
morfismo G6986A

50 <400> 116
ccaggaagcc agacttgat 20

55 <210> 117
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen transportador de serotonina (SLC6A4) en el que puede existir el
polimorfismo delección de 44 pb en el promotor

65

ES 2 356 458 A1

<400> 117
accctaag tcctactgc 20

5
<210> 118
<211> 19
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen transportador de serotonina (SLC6A4) en el que puede existir el
15 polimorfismo deleción de 4 4 pb en el promotor

<400> 118
ggagatcctg ggagaggtg 19

20
<210> 119
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutation S-transferasa M3 (GSTM3) en el que puede existir el
polimorfismo delAGA (alelo*B)

<400> 119
35 ttctgggaa attctcatgg 20

<210> 120
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutation S-transferasa M3 (GSTM3) en el que puede existir el
polimorfismo delAGA (alelo*B)

50 <400> 120
tcaggttgg gaactcatcc 20

55 <210> 121
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutation S-transferasa MI (GSTM1) en el que puede existir el
polimorfismo alelo nulo

65

ES 2 356 458 A1

<400> 121
atggtttgca gaaacaagg 20

5 <210> 122
<211> 20
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutation S-transferasa MI (GSTM1) en el que puede existir el
15 polimorfismo alelo nulo

<400> 122
aaagcgggag atgaagtcct 20

<210> 123
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen glutation S-transferasa ni (GSTT1) en el que puede existir el
polimorfismo alelo nulo

<400> 123
35 ggcagcataa gcaggactc 20

<210> 124
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen glutation S-transferasa ni (GSTT1) en el que puede existir el
polimorfismo alelo nulo

50 <400> 124
gttgctcgag gacaagttcc 20

55 <210> 125
<211> 17
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60 <220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen apolipoproteína E (APOE) en la que pueden existir los polimor-
fismos Arg158Cys y Cys112Arg

65

ES 2 356 458 A1

<400> 125
gcacggctgt ccaagga 17

5
<210> 126
<211> 17
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen apolipoproteína E (APOE) en la que pueden existir los polimorfismos Arg158Cys y Cys122Arg
15

<400> 126
gcgggccccg gcctggt 17

20
<210> 127
<211> 20
<212> ADN
25 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor (TNF) en el que puede existir el polimorfismo G-308A

<400> 127
35 acctgtccc caaagaaat 20

<210> 128
40 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen tumor necrosis factor (TNF) en el que puede existir el polimorfismo G-308A
45

<400> 128
50 aaagttgggg acacacaagc 20

<210> 129
55 <211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

60
<220> ADN sintético
<223> Oligo 1 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo G-1082A
65

ES 2 356 458 A1

<400> 129

cacacacaca cacaatcca ag

22

5

<210> 130

<211> 20

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Oligo 2 para amplificar el fragmento del gen interleucina 10 (IL10) en el que puede existir el polimorfismo G-1082A

<400> 130

20

gatggggtgg aagaagtga

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200901846

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68**(2006.01)
G06F19/00(2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KOZAL M. J. et al. "EXTENSIVE POLYMORPHISMS OBSERVED IN HIV-1 CLADE B PROTEASE GENE USING HIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS". NATURE MEDICINE. 01-07-1996. Vol. 2. Nº.7. Páginas 753 - 759. ISSN 1078-8956.	1-7
X	CHEE M. et al. "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS". SCIENCE. 25.10.1996. Vol. 274. Páginas 610 - 614. ISSN 0036-8075	1-7
X	SAPOLSKY R. J.et al. "High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays". GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING. 01-02-1999. Vol. 14. Nº 5-6. Páginas 187 - 192. ISSN 1050-3862.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

Fecha de realización del informe
01.12.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200901846

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68**(2006.01)
G06F19/00(2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CUTLER D. J. et al."High-throughput variation detection and genotyping using microarrays". GENOME RESEARCH. 01-11-2001.Vol. 11. Nº 11. Páginas 1913 - 1925. ISSN 1088-9051.	1-7
X	WO 0129269 A2 (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 26.04.2001	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.12.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
2/5

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

C12Q, G06F

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-7	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KOZAL M. J. et al. "EXTENSIVE POLYMORPHISMS OBSERVED IN HIV-1 CLADE B PROTEASE GENE USING HIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS". NATURE MEDICINE. 01-07-1996. Vol. 2. Nº.7. Páginas 753 - 759. ISSN 1078-8956.	
D02	CHEE M. et al. "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS". SCIENCE. 25.10.1996. Vol. 274. Páginas 610 - 614. ISSN 0036-8075	
D03	SAPOLSKY R. J. et al. "High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays". GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING. 01-02-1999. Vol. 14. Nº 5-6. Páginas 187 - 192. ISSN 1050-3862.	
D04	CUTLER D. J. et al. "High-throughput variation detection and genotyping using microarrays". GENOME RESEARCH. 01-11-2001. Vol. 11. Nº 11. Páginas 1913 - 1925. ISSN 1088-9051.	
D05	WO 0129269 A2 (UNIV CASE WESTERN RESERVE)	26.04.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un método de genotipado de múltiples variantes génicas humanas presentes en uno o más genes de un sujeto asociadas a reacciones adversas a fármacos.

En concreto, las reivindicaciones 1, 3, 6 y 7 caracterizan el método por las etapas del procedimiento. La reivindicación 2 caracteriza un DNA chip diseñado para llevar a cabo el método. Las reivindicaciones 4 y 5 se refieren al uso de un Kit para desarrollar el método.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior divulgan un método de arrays de alta densidad con las mismas características para detectar en sujetos reacciones adversas a fármacos, por lo que, en este sentido las reivindicaciones serían nuevas .

Sin embargo, tales reivindicaciones carecerían actividad inventiva. A la luz del estado de la técnica anterior, la mayoría de las características técnicas del método de genotipado de variaciones génicas de la presente reivindicación 1 y el DNA-chip de la reivindicación 2, aparecen divulgadas en numerosos documentos: D1 (resumen y figura 3), D2 (resumen y figura 1), D3 (resumen y figura 2), D4 (resumen y figura 1) y D5 (todo el documento, especialmente reivindicaciones 14-15). Por lo tanto, la diferencia entre la presente solicitud y el estado de la técnica podría identificarse, entre otras las siguientes: el que por cada variación génica a identificar se usen 4 sondas, o que de las 4 sondas 2 detectan la primera variación y otras 2 la segunda, o que el soporte comprenda una pluralidad de sondas que detectan múltiples polimorfismos (que aparecen en la reivindicación 1). Sin embargo, de estas diferencias, tomadas solas o en combinación, no parece derivarse efecto técnico alguno que suponga una contribución al estado de la técnica, por lo que el problema que plantearía la invención sería el de la provisión de utilidades alternativas de un método que, en sí, es de sobra conocido en el estado de la técnica. La solución a este problema sería la identificación de variantes génicas humanas y su asociación a situaciones de reacciones adversas a fármacos, considerándose una alternativa obvia a las diversas aplicaciones que se podrían encontrar para un método de genotipado de variaciones génicas con arrays de alta densidad.