

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 735**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07797432 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2016198**

54 Título: **Procedimiento para la predicción de un riesgo de reacciones adversas a medicamentos mediante la determinación de HLA-B 1502**

30 Prioridad:

11.05.2006 US 800121 P

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

13.09.2013

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (50.0%)
128, Sec. 2, Acedemia Sinica Road Nan-Kang
Taipei
115 Taiwan, CN y
PHARMIGENE INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHEN, YUAN-TSONG;
HUNG, SHUEN-LU;
SHEN, CHIH-LUNG;
CHANG, CHI-FENG;
LIN, HSIN-YU y
CHEN, WEI-HSUAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 422 735 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la predicción de un riesgo de reacciones adversas a medicamentos mediante la determinación de HLA-B 1502

Antecedentes

5 Una reacción adversa a un medicamento (RAM) es un efecto no deseado y no intencionado de un fármaco. En particular, una reacción adversa a un medicamento se produce a dosis utilizadas para profilaxis, diagnóstico o tratamiento. De acuerdo con un meta-análisis ampliamente citado, las RAM se clasificaron entre la cuarta y la sexta causa de muerte más frecuente (Lazarou et al, JAMA, 279(15): 1200-1205, 1998). Las RAM cutáneas representan aproximadamente el 2-3 % de todos los ingresos hospitalarios (Bigby et al. JAMA, 256(24):3358-3363, 1986). Van desde exantema maculopapular (EMP) leve, con intensidad creciente, hasta RAM potencialmente mortales, tales como el síndrome de hipersensibilidad (SHS), el síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) y la necrólisis epidérmica tóxica (NET, síndrome de Lyell). La tasa de mortalidad de esta última puede ser de hasta del 40 %.

10 El SHS se caracteriza por afectación multiorgánica (por ejemplo, hepatitis o nefritis) acompañado de manifestaciones sistémicas (por ejemplo, fiebre, artralgia, eosinofilia y adenopatías) además de la erupción cutánea (Roujeau et al. N. Engl. J. Med., 331: 1272-1285, 1994). El SSJ y la NET son trastornos de hipersensibilidad mediados por complejos inmunitarios que se caracterizan por un rápido desarrollo de exantema vesicular de máculas púrpuras y lesiones tipo diana acompañado de afectación muscular y desprendimiento de la piel (Roujeau et al. J Invest Dermatol, 1994, 102:218 S-30S). Estos están causados principalmente por fármacos, tales como sulfonamidas, anticonvulsivos, alopurinol, antiinflamatorios no esteroideos y antipalúdicos (Roujeau et al., N. Engl. J. Med., 333(24):1600-1607, 1995). En Taiwán, los anticonvulsivos (por ejemplo, CBZ, fenitoína y fenobarbital) y alopurinol son los medicamentos que con más frecuencia causan SSJ/NET.

15 La evolución reciente de la farmacogenómica ha implicado que la susceptibilidad a las RAM está asociada con determinados alelos génicos. Por ejemplo, se ha descubierto que los polimorfismos genómicos del gen de la tiopurina metiltransferasa están estrechamente relacionados con las RAM inducidas por azatioprina, un fármaco para enfermedades reumatológicas o cancerosas (Yates et al., Ann. Intern. Med., 126(8):608-614, 1997). También se ha sugerido que la susceptibilidad al SSJ/NET/SHS inducida por ciertos fármacos está determinada genéticamente (Gennis MA. Am. J. Med., 91(6):631-634, 1991; Edwards SG, Postgrad. Med. J., 75(889):680-681, 1999). Sin embargo, aún no se han identificado los factores genéticos responsables exactos.

20 Chung WH et al, Nature, vol. 428(6982), p. 486, (2004) y el documento US-A-2005/100926 divulgan ambos que HLA-B1502 se asocia significativamente con SSJ/NET inducido por carbamazepina.

Estos estudios de farmacogenómica sugieren que la detección de alelos asociados a RAM en un paciente es un enfoque útil para evaluar si ese paciente está en riesgo de desarrollar RAM. Este tipo de diagnóstico molecular certificado por Clinical Laboratory Improvement Amendments se ofrece ahora por los laboratorios de referencia en los EE.UU. y Europa.

35 Para determinar la presencia de un alelo genético particular, es necesario detectar uno de los nucleótidos más específicos de alelos. En muchos casos, hay que dirigirse a múltiples regiones dentro del alelo para lograr una determinación exacta. Por ejemplo, los procedimientos actualmente disponibles para la determinación de un alelo HLA-B (por ejemplo, HLA-B*1502 o HLA-B*5801) requiere la detección de al menos 6 regiones dentro de ese alelo.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir el riesgo de un paciente de desarrollar reacciones adversas a los medicamentos, particularmente SSJ, NET o SHS. Se descubrió que el HLA-B*1502 está asociado al SSJ/NET inducido por diversos fármacos, por ejemplo, carbamazepina (CBZ). Además, HLA-B*5801 se asocia particularmente con SSJ/NET inducido por alopurinol. HLA-B*5801 se asocia también con SHS inducido por alopurinol. Reacciones cutáneas más leves inducidas por CBZ, tales como exantema maculopapular, eritema multiforme, urticaria y exantema fijo medicamentoso, están particularmente asociados con HLA-B*4601.

En consecuencia, la presente solicitud proporciona un procedimiento para evaluar el riesgo de un paciente de acuerdo con las reivindicaciones.

50 Un alelo genético puede ser detectado por detección directa de regiones/nucleótidos dentro del alelo utilizando los ADN genómicos preparados a partir de muestras biológicas, por ejemplo, sangre, saliva, orina o cabello. El alelo también se puede detectar mediante, por ejemplo, procedimientos serológicos o de microcitotoxicidad. También se puede determinar mediante la detección de un marcador genético equivalente del alelo, que puede ser, por ejemplo, un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido), un marcador microsátélite u otros tipos de polimorfismos genéticos. En otras palabras, la presencia del haplotipo HLA-B*1502, el lugar del alelo *per se*, es indicativo de un riesgo de reacciones adversas a los medicamentos. Ejemplos de marcadores genéticos equivalentes al haplotipo HLA-B*1502 incluyen DRB1*1202, Cw*080,1, Cw*0806, A*1101 y MICA*019.

Se divulga un procedimiento para la determinación del perfil farmacogenómico. Este procedimiento incluye la determinación de la presencia de al menos un alelo HLA-B seleccionado del grupo que consiste en HLA-B*1502, HLA-B*5801 y HLA-B*4601. Se puede determinar la presencia de al menos dos alelos seleccionados del grupo, tales como HLA-B*1502 y HLA-B*5801 o la presencia de los tres alelos. El procedimiento puede comprender, opcionalmente, la determinación de otros factores genéticos. Esos otros factores genéticos pueden estar asociados con la predisposición a cualquier enfermedad o trastorno médico, incluyendo las RAM. Por ejemplo, estos otros factores genéticos se pueden seleccionar del grupo que consiste en tiopurina metiltransferasa y los genes del síndrome de QT largo.

Se divulga un procedimiento para determinar si un paciente es portador de HLA-B*1502 o HLA-B*5801. Este procedimiento incluye las etapas de: (1) detectar una primera región seleccionada de cualquiera de las Regiones 1-6 de HLA-B*1502 o las Regiones 1-6 de HLA-B*5801, (2) detectar una segunda región seleccionada de cualquiera de las Regiones 1-6 de HLA-B*1502 o las Regiones 1-6 de HLA-B*5801, siendo la segunda región diferente de la primera región y (3) determinar si el paciente es portador del alelo de interés, indicando la presencia de la primera y segunda regiones que el paciente es portador de HLA-B*1502 o HLA-B*5801. Estas regiones pueden ser detectadas por PCR en tiempo real o ensayo de hibridación competitiva de oligonucleótido específico de secuencia junto con ELISA (CSSO-ELISA). En un ejemplo, la detección de dos regiones seleccionadas de las Regiones 1-6 de HLA-B*1502 o de las regiones 1-6 de HLA-B*5801 es suficiente para determinar la presencia o ausencia de los alelos HLA-B*1502 o HLA-B*5801. Alternativamente, se detectan tres o más regiones dentro de HLA-B*1502 o HLA-B*580.

La detección de la Región 1, la Región 2, la Región 3 y de HLA-B*1502 se puede lograr, respectivamente, mediante la identificación de los nucleótidos en las posiciones 1 y 3 de la Región 1, en las posiciones 1 y 6 de la Región 2 y en las posiciones 1 y 3 de la Región 3 (incluyendo los nucleótidos en la cadena sentido o en la cadena antisentido en estas posiciones).

La detección de las Regiones 1-6 de HLA-B*5801 se puede lograr, respectivamente, mediante la identificación de los nucleótidos en las posiciones 1, 2 y 5 en la Región 1, en las posiciones 1, 4, 6, 7, 8, 15, 16, y 20 en la Región 2, en las posiciones 2, 4, 5, 8, y 9 en la Región 3, en las posiciones 3 y 5 en la Región 4, en las posiciones 1 y 9 en la Región 5 y en las posiciones 3 y 10 en la Región 6.

Se divulga un kit para detectar un alelo genético, por ejemplo, HLA-B*1502 o HLA-B*5801. Este kit puede contener una primera sonda y una segunda sonda, cada una dirigida a una región seleccionada de las Regiones 1-6 de HLA-B*1502 o las Regiones 1-6 de HLA-B*5801. Las dos sondas se dirigen a diferentes regiones. El kit puede incluir además una tercera sonda que se dirige a un alelo de control interno. También puede incluir una o más sondas adicionales para la detección de una o más regiones adicionales dentro de HLA-B*1502 o HLA-B*5801.

También se divulga un procedimiento para determinar si un compuesto es un candidato que induce una RAM (por ejemplo, SSJ/NET, SHS o una RAM cutánea más leve) en un paciente portador de un alelo de HLA (por ejemplo, HLA-B*1502, HLA-B*5801 o HLA-B*4601) asociada con la RAM inducida por un fármaco (por ejemplo, CBZ, alopurinol o fenitoína). Este procedimiento incluye las etapas de: (1) aislar los linfocitos T de un paciente con una RAM que es portador un alelo de HLA asociado con la RAM, (2) amplificar los linfocitos T reactivos al fármaco que induce la RAM, (3) aislar las células presentadoras de antígeno del paciente (4) poner en contacto las células amplificadas con un compuesto en presencia de las CPA y (5) examinar si el compuesto que activa los linfocitos T amplificadas es un candidato que induce la RAM en un paciente que es portador del mismo alelo de HLA.

Un paciente tiene un "riesgo" de una RAM si la probabilidad del paciente de desarrollar una RAM es mayor que la probabilidad de la población general de desarrollar la RAM. La probabilidad del paciente de desarrollar la RAM es al menos aproximadamente 1,3 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 2 veces, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 veces y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces tan alta como la probabilidad de la población general de desarrollar la RAM. La probabilidad se puede determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como mediante el uso de la incidencia de los factores de riesgo. Por ejemplo, un factor de riesgo dado está presente en el 5 % de la población general, si este factor está presente en el 10 % de los pacientes que tienen una RAM, entonces la probabilidad de que un paciente con este factor de riesgo desarrolle la RAM es 2 veces tan alta como la probabilidad de la población general de desarrollar la RAM.

Un "factor de riesgo" de una RAM es un factor que se asocia a la RAM. La sensibilidad de un factor de riesgo es preferiblemente al menos aproximadamente el 40 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 % o 90 %. Más preferiblemente, la sensibilidad es al menos del 95 %. La "sensibilidad" de un factor de riesgo para predecir una RAM es el porcentaje de pacientes con la RAM que poseen el factor de riesgo. En otras palabras, si cada paciente con SSJ tiene el alelo A, la sensibilidad del alelo A para predecir el SSJ es 100 %. Si 20 de 40 pacientes con SSJ tienen el alelo B, entonces la sensibilidad del alelo B para predecir el SSJ del 50 %.

Un "marcador genético equivalente" de un alelo de interés se refiere a un marcador genético que está ligado al alelo de interés, es decir, muestra un desequilibrio de ligamiento con el alelo de interés.

La "determinación del perfil farmacogenómico" se refiere a la determinación de los factores genéticos presentes en un sujeto que están asociados con enfermedades o trastornos médicos, en particular reacciones adversas a los medicamentos. Generalmente, en el perfil farmacogenómico se determina un panel de factores genéticos y los factores pueden o no estar asociados con la misma enfermedad, trastorno médico o reacción al fármaco.

5 Los detalles de una o más implementaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción.

Descripción detallada de la invención

10 Algunos datos sugieren que la patogénesis de varias RAM multisistémicas similares implica la presentación restringida del MHC de un fármaco o sus metabolitos, que o bien se unen directamente a las moléculas del MHC o se unen a proteínas endógenas y la activación de linfocitos T (Svensson et al., Pharmacol. Rev., 53 (3):357-379, 2000). Se observó que los linfocitos T citotóxicos CD8+ que se infiltran en la piel eran dominantes en reacciones ampollasas, tal como SSJ/NET (Hari et al., Clin. Exp. Allergy, 31(9):1398-1408, 2001), mientras que los linfocitos T cooperadores CD4+ eran característicos de RAM más leves, tales como exantema maculopapular (Pichler et al., Int. Arch. Allergy Immunol., 113(1-3):177-180, 1997).

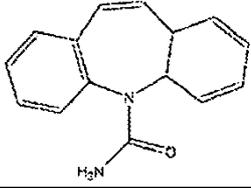
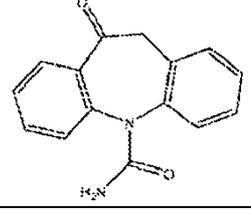
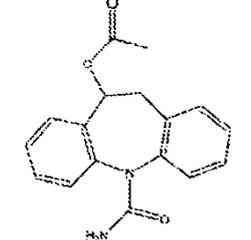
15 Se descubrió que HLA-B*1502, HLA-B*5801 y HLA-B*4601 están asociados respectivamente con SSJ/NET inducido por CBZ, con SSJ/NET/SHS inducido por alopurinol y con RAM cutáneas más leves (por ejemplo, exantema maculopapular, eritema multiforme, urticaria o exantema fijo medicamentoso) inducidas por CBZ. Por lo tanto, estos alelos HLA-B son marcadores genéticos útiles para determinar si un paciente está en riesgo de desarrollar RAM (por ejemplo, SJS, NET, SHS o RAM cutáneas más leves) inducidas por compuestos CBZ, compuestos de alopurinol o fármacos de otra manera que tienen estructuras similares a los mismos.

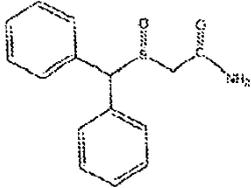
20 CBZ, también conocido como Tegretol, Tegol, G-32883, Biston, Calepsin, Carbatrol, Epitol, Finlepsin, Sirtal, Stazepine, Telesmin o Timonil, es un anticonvulsionante aromático. Otros anticonvulsionantes aromáticos, como la fenitoína (Dilantin) y fenobarbital, causan RAM adversas similares al CBZ. Por lo tanto, HLA-B*1502 se puede emplear para evaluar también el riesgo de RAM a estas reacciones adversas a estos otros anticonvulsivantes aromáticos. Los anticonvulsionantes aromáticos para los que HLA-B*1502 también se puede utilizar como un factor de riesgo también incluyen compuestos o metabolitos de CBZ, fenitoína o fenobarbital. Los metabolitos de estos fármacos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Gennis et al, 1991:Leeder, Epilepsia, 39 Suppl. 7:S8-16, 1998; Naisbitt et al., Mol. Pharmacol., 63(3):732-741, 2003), tales como CBZ-10, epóxido 11, CBZ-10, 11-diol, CBZ-2,3-diol, dihidro CBZ, CHZ catecol y CBZ o-quinona, p-hidroxi-fenitoína, fenitoína dihidrodiol, fenitoína catecol, fenitoína metilcatecol y fenitoína o-quinona.

30 El alopurinol es un fármaco para la hiperuricemia y la gota crónica.

La Tabla I muestra ejemplos de compuestos que pueden inducir SSJ/NET en un portador de HLA-B*1502.

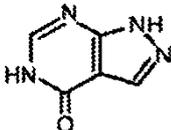
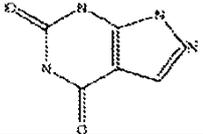
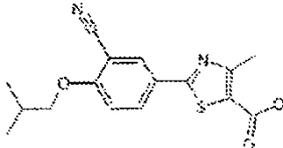
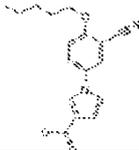
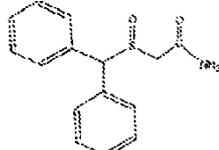
Tabla 1. Compuestos farmacológicos asociados con SSJ en pacientes portadores de HLA-B*1502

Nombres del principio activo o marca comercial	Estructuras del principio activo
carbamazepina, Epitol, Tegretol, Microtrol Bipotrol, carbamazepina, carbamazepina, Pharmavene, carbamazepina, Carbatrol, SPD-417-5H-dibenz[b,f] azepina-5-carboxamida [CAS]	
Oxcarbazepina, Trileptal GP-47680, GP-47779, GP-47779 MHD, KIN-493, oxcarbazepina, TRI-476, TRI-477, TRI-477 (MHD), Trileptal NP, [CAS]: 5H-dibenz [b,f]azepin-5-carboxamida, 10,11-dihidro-10-oxo	
licarbazepina BIA-2-093-BIA 2-005 [CAS]: (S)-(-)-10-acetoxi-10,11-dihidro-5H-dibenzo[b, f]azepin-5-carboxamida	

modafinilo, Sparlon (fármaco de nueva formulación), [CAS]: acetamida, 2- [(difenilmetil)sulfinil]-	
---	---

La presencia de HLA-B*5801 en un paciente indica que el paciente está en riesgo de SSJ/NET o SHS inducido por compuestos de alopurinol, compuestos de otro modo estructuralmente similares a alopurinol o metabolitos de los mismos. La Tabla II muestra ejemplos de compuestos que pueden inducir SSJ/NET o SHS en pacientes portadores de HLA-B*5801.

5 Tabla II: Compuestos farmacológicos asociados con SSJ en pacientes portadores de HLA-B*5801

Nombres	Estructura del principio activo
Alopurinol , Aloprim, Zyloprim, Apo-alopurinol, Purinol	
Oxipurinol, Oxyprim [CAS]: 1H-pirazol[3,4-d] pirimidin-4, 6(5H,7H)-diona	
Febuxostat, TEI-6720, TMX-67 [CAS]: ácido 5-tiazolocarboxílico, 2-[3-ciano-4-(2-metilpropoxi) fenil]-4-metil-	
Y-700 ácido 1-(3-ciano-4-neopentiloxifenil) pirazol-4-carboxílico	
modafinilo, Sparlon (fármaco de nueva formulación), [CAS]: acetamida, 2- [(difenilmetil)sulfinil]-	

La presencia de HLA-B*4601 en un paciente indica que el paciente está en riesgo de desarrollar RAM cutáneas leves, por ejemplo, exantema maculopapular, inducidas por CBZ.

10 Otros alelos HLA-B también pueden mostrar predisposición a RAM cutáneas. Por ejemplo, la espondilitis anquilosante se asocia fuertemente con los alelos HLA-B27, tales como B*2701-B*2723. (Khan, Curr. Opin. Rheumatol., 12(4):235-238, 2000; Feltkamp et al., Curr. Opin. Rheumatol., 13(4):285-290, 2001).

15 La presencia de un marcador genético (por ejemplo, un alelo de HLA) se puede determinar mediante la detección directa de ese marcador o regiones particulares dentro de ella. Los ADN genómicos para la detección del alelo se pueden preparar a partir de un paciente por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, sistema de purificación de ADN PUREGENE de Centra Systems, Minnesota. La detección de una región dentro de un marcador genético de interés incluye el examen del nucleótido(s) situado(s) en la cadena sentido o en la cadena antisentido dentro de esa región. Los procedimientos conocidos en la técnica se pueden usar para detectar una región en particular, por ejemplo, hibridación de oligonucleótidos de secuencia específica, PCR en tiempo real o CSSO-ELISA (M. Hiratsuka et al. J. of Biochemical and Biophysic, Methods, 67:87-94, 2006).

La presencia de HLA-B*1502 se puede determinar mediante la detección de al menos dos de las Regiones 1-6 que se muestran en la figura. 1. La presencia de estas regiones se puede determinar mediante la detección de nucleótidos en ciertas posiciones dentro de estas regiones, por ejemplo, las posiciones 1 y 3 en la Región 1, las posiciones 1 y 6 en la Región 2 y las posiciones 1 y 3 en la región 3. La presencia de cualquiera de las dos Regiones 1-6 indica que el paciente es un portador de HLA-B*1502.

La presencia de HLA-B*5801 se puede determinar mediante la detección de al menos dos de las Regiones 1-6 que se muestran en la figura. 2. La presencia de estas regiones se puede determinar mediante la detección de los nucleótidos en ciertas posiciones dentro de estas regiones, por ejemplo, las posiciones 1, 2, y 5 en la Región 1, las posiciones 1, 4, 6, 7, 8, 15, 16, y 20 en la Región 2, las posiciones 2, 4, 5, 8, y 9 en la Región 3, las posiciones 3 y 5 en la Región 4, las posiciones 1 y 9 en la Región 5, y las posiciones 3 y 10 en la Región 6. La presencia de cualquiera de las dos Regiones 1-6 indica que el paciente es un portador de HLA-B*5801.

Los productos de ADN obtenidos de la PCR se pueden detectar usando sondas específicas de secuencia, por ejemplo, sondas de hidrólisis de TaqMan, Beacons, Scorpions o sondas de hibridación; estas sondas están diseñadas de tal manera que se unen a las regiones de interés, por ejemplo, las Regiones 1-6 de HLA-B*1502 o las Regiones 1-6 de HLA-B*5801. Los productos de PCR también pueden ser detectados por los agentes de unión a ADN, por ejemplo, SYBR[®] Green.

La presencia de un alelo de interés también se puede determinar mediante la detección de marcadores genéticos equivalentes al alelo. Los marcadores genéticos cercanos al alelo de interés tienden a co-segregar o muestran un desequilibrio de ligamiento con el alelo. Por consiguiente, la presencia de estos marcadores (marcadores genéticos equivalentes) es indicativa de la presencia del alelo de interés, el cual, a su vez, es indicativo de un riesgo para el desarrollo de RAM. Ejemplos de marcadores genéticos equivalentes a HLA-B*1502 incluyen DRB1* 1202, Cw*0801, Cw*0806, A*1101 y MICA*019. Ejemplos de marcadores equivalentes a HLA-B*5801 incluyen A*3303, Cw*0302, DRB1*0301 y MICA*00201.

Un marcador genético equivalente puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un alelo de HLA, un marcador microsatélite o un marcador polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Un marcador genético equivalente útil tiene normalmente aproximadamente unos 200 kb o menos (por ejemplo, 100 kb, 80 kb, 60 kb, 40 kb o 20 kb) de los alelos de interés. Se pueden utilizar procedimientos descritos anteriormente o conocidos en la técnica para detectar la presencia o ausencia de un marcador genético equivalente.

Alternativamente, o además, se pueden detectar los ARN, los ADNc o los productos proteínas de los alelos de interés para determinar la presencia o ausencia del alelo. Por ejemplo, se pueden utilizar los procedimientos de serotipificación o de microcitotoxicidad para determinar el producto proteína de un alelo de HLA.

Para aumentar aún más la exactitud de la predicción del riesgo, el alelo de interés y/o su marcador genético equivalente se puede determinar junto con los marcadores genéticos de moléculas accesorias y moléculas coestimuladoras que están implicadas en la interacción entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T. Estos marcadores genéticos incluyen marcadores microsatélite y de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Las moléculas accesorias y coestimuladoras incluyen moléculas de la superficie celular (por ejemplo, CD80, CD86, CD28, CD4, CD8, receptor de linfocitos T (TCR), ICAM-1, CD11a, CD58, CD2, etc.) y las citocinas inflamatorias o pro-inflamatorias, quimiocinas (por ejemplo, TNF- α) y mediadores (por ejemplo, complementos, proteínas de apoptosis, enzimas, componentes de la matriz extracelular, etc.). También son de interés marcadores genéticos de enzimas que metabolizan fármacos que están implicadas en la bioactivación o la desintoxicación de fármacos. Estos marcadores genéticos también incluyen marcadores microsatélite y SNP. Las enzimas que metabolizan fármacos incluyen enzimas de fase I (por ejemplo, la superfamilia del citocromo P450 etc.) y las enzimas de fase II (por ejemplo, la epóxido hidrolasa microsomal, la arilamina N-acetiltransferasa, la UDP-glucuronosil-transferasa, etc.).

Se divulga un procedimiento para la determinación del perfil farmacogenómico. Un panel de factores genéticos se determina para un individuo dado, y cada factor genético está asociado con la predisposición para una enfermedad o trastorno médico, incluyendo las RAM. En el procedimiento, el panel de factores genéticos incluye al menos un alelo seleccionado del grupo que consiste en HLA-B*1502, HLA-B*5801 y HLA-B*4601. El panel puede incluir dos alelos o los tres alelos del grupo. Además de HLA-B*1502, 5801 y/o 4601, el panel puede incluir otros factores genéticos conocidos, tales como tiopurina metiltransferasa y los genes para el síndrome de QT largo. Los marcadores genéticos de moléculas accesorias, moléculas co-estimuladoras y/o enzimas que metabolizan el fármaco descritos anteriormente también pueden ser incluidos.

Se divulga un kit que contiene sondas para la detección de marcadores genéticos, por ejemplo, HLA-B*1502, HLA-B*5801 o HLA-B*4601. El término "sonda" usado en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia útil para la detección de otra sustancia. Por lo tanto, una sonda puede ser un oligonucleótido o un oligonucleótido conjugado que se hibrida específicamente con una región particular dentro de un alelo de interés. El oligonucleótido conjugado se refiere a un oligonucleótido unido covalentemente a un cromóforo o a moléculas que contienen un ligando (por ejemplo, un antígeno), que es muy específico de un receptor molecular (por ejemplo, un anticuerpo específico del antígeno). La sonda también puede ser un cebador de PCR, junto con otro cebador, para amplificar una región particular dentro del alelo de interés. Además, la sonda puede ser un anticuerpo que reconoce un alelo de interés o

un producto proteína del alelo. Opcionalmente, el kit puede contener una sonda que se dirige a un alelo de control interno, que puede ser cualquier alelo que se presenta en la población en general, por ejemplo, CAPDH, β -actina, KIR. La detección de un alelo de control interno está diseñado para asegurar la eficacia del kit.

5 El kit puede incluir, además, herramientas y/o reactivos para recoger muestras biológicas de pacientes, así como aquellos para la preparación de ADN genómico, ADNc, ARN o proteínas a partir de las muestras. Por ejemplo, pueden incluirse cebadores de PCR para amplificar las regiones relevantes del ADN genómico. El kit también puede contener sondas de factores genéticos útiles en aplicaciones para la determinación del perfil farmacogenómico, por ejemplo, tiopurina metiltransferasa.

10 El kit puede contener una primera sonda y una segunda sonda, cada una para la detección de una región seleccionada de la Regiones 1-6 de HLA-B*1502 o de las Regiones 1-6 de HLA-B*5801. La primera y segunda sondas se dirigen a diferentes regiones. Estas dos sondas pueden ser un par de cebadores de PCR, u oligonucleótidos marcados útiles en ensayos de hibridación. Opcionalmente, el kit puede incluir una tercera sonda para la detección de un alelo de control interno. También puede incluir sondas adicionales para la detección de regiones adicionales dentro de HLA-B*1502 o HLA-B*5801.

15 Se divulga un procedimiento de identificación de un compuesto farmacológico que induce una RAM (por ejemplo, SSJ/NET o SHS) en un paciente portador de un alelo de HLA asociado con la RAM (por ejemplo, HLA-B*1502, HLA-B*5801 o HLA-B*4601). Se sugiere que los medicamentos pueden ser presentados por ciertos complejos de HLA para activar los linfocitos T, induciendo por consiguiente las RAM. Se sugiere que los linfocitos T reactivos a estos fármacos participan en el desarrollo de RAM inducidas por estos fármacos. Por lo tanto, los compuestos que pueden
20 activar estas células son candidatos para la inducción de RAM en un paciente portador de uno o más alelos HLA asociados con estas RAM. Por consiguiente, este procedimiento se puede utilizar como un procedimiento de cribado en el desarrollo de nuevos medicamentos para averiguar si estos compuestos farmacológicos pueden inducir dichas RAM.

25 La genotipificación se puede realizar en un paciente que ha sufrido una RAM para determinar si el paciente es portador de un alelo de HLA asociado con la enfermedad. Los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, linfocitos B o monocitos) se pueden aislar del paciente y cultivar in vitro siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica. (Naisbitt DJ, Mol Pharmacol. 2003 Mar;63(3):732-41, Wu et al. J Allergy Clin Immunol. 2006 Jul;118(1):233-41. Publicación electrónica el 27 de abril 2006). Los linfocitos B así aislados pueden ser transformadas por el virus de Epstein-Bar para generar líneas de linfocitos B. Los linfocitos T reactivos a un fármaco se pueden
30 ampliar en la presencia de tanto del fármaco como de células presentadoras de antígeno autólogas. Los linfocitos T ampliados se pueden exponer a continuación a un compuesto de ensayo en presencia de células presentadoras de antígeno autólogas para determinar si el compuesto de ensayo puede activar los linfocitos T. Si es así, el compuesto de ensayo es un candidato que puede inducir la RAM en un paciente que es portador del mismo alelo de HLA.

35 Los siguientes ejemplos han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitarse del resto de la descripción en modo alguno.

Ejemplo 1. Detección de HLA-B*1502 y HLA-B*5801 usando PCR en tiempo real

Los ADN genómicos fueron extraídos de la sangre o la saliva de un paciente. Se sintetizaron tres pares de cebadores PCR dirigidos cada una de ellos a las Regiones 1 y 5, Regiones 1 y 4 o Regiones 1, 3 y 4 de HLA-B*1502 (ver Fig. 1). Además, se sintetizaron un par de cebadores dirigidos a las Regiones 2 y 4 de HLA-B*5801 (véase la
40 fig. 2). Las regiones seleccionadas se amplificaron y se detectaron utilizando el sistema de PCR en tiempo real SYBR[®] Green (Applied Biosystems). En resumen, los cebadores, los ADN genómicos y la mezcla maestra de PCR Power SYBR[®] Green (incluido en el sistema de PCR en tiempo real) se mezclaron conjuntamente y la PCR se llevó a cabo mediante: (i) la activación de la polimerasa a 95 °C durante 10 minutos, (ii) la desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos e hibridando/elongando las cadenas de ADN a 71 °C durante 1 minuto, (iii) realizando 40 ciclos
45 de desnaturalización/hibridación/elongación y (iv) disociando el producto amplificado de su molde a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. La amplificación por PCR de un receptor de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR) se aplicó como un control interno. La presencia o ausencia de HLA-B*1502 o HLA-B*5801 en un paciente se determinó basándose en el valor de Ct de HLA-B*1502 o HLA-B*5801 y la diferencia de los valores de Ct (valor Δ Ct) entre HLA-B*1502/HLA-B*5801 y KIR. El valor de Ct (ciclo umbral) se determina mediante la
50 identificación del número de ciclo en el cual la intensidad de emisión de color indicador está por encima del ruido de fondo. El ciclo umbral se determina en la fase más exponencial de la reacción y es más fiable que las mediciones de punto final de los productos de PCR acumulados utilizados por procedimientos tradicionales de PCR. El ciclo umbral es inversamente proporcional al número de copias del molde diana, cuanto mayor es el número de molde, más bajo es el ciclo umbral medido.

55 Se analizaron 170 muestras de ADN genómico extraídas de líneas de linfocitos B humanos y 35 muestras de ADN genómico preparadas a partir de sangre o saliva humanas para detectar la presencia de HLA-B*1502 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los valores Ct de HLA-B*1502 y KIR estaban en el intervalos de 23-27 y 19-25, respectivamente. Los HLA-B*1502 fueron reconocidos como positivos cuando el intervalo de Δ Ct entre HLA-B*1502 y KIR era menor de 7. En estos 170 supercontroles, había presentes 15 g de ADN con HLA-B*1502 y fueron

verificados con los kits Dynal SSO y los resultados indican que tanto la sensibilidad como la especificidad de este procedimiento alcanzan > 99 %.

5 Se analizaron 170 muestras de ADN genómico extraídas de líneas de linfocitos B humanos y 87 muestras de ADN genómico preparadas a partir de sangre o saliva humanas para detectar la presencia de HLA-B*5801 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Para las muestras de ADN derivadas de pacientes positivos para HLA-B*5801, los valores de Ct de HLA-B*5801 y KIR estaban en el intervalo de 22-28 y 10-26, respectivamente. Los HLA-B*5801 fueron reconocidos como positivos cuando el intervalo de Δ Ct entre HLA-B*5801 y KIR era menor que 7. Para las muestras de ADN derivadas de pacientes HLA-B*5801 negativo, el valor de Ct de HLA-B*5801 era de aproximadamente 34 y Δ Ct era mayor que 13. En todas las muestras, se encontraron 51 g de DNA HLA-B*5801 positivo y fueron verificados con los kits Dynal SSO. Estos resultados indican que tanto la sensibilidad como la especificidad de este procedimiento alcanzó >99 %.

Ejemplo 2. Detección de HLA-B*1502 y HLA-B*5801 usando CSSO-ELISA

Los procedimientos para llevar a cabo el CSSO-ELISA se resumen en la figura. 3.

15 En general, usando ADN genómicos como moldes, se llevaron a cabo las PCR para producir productos de PCR que contienen las regiones específicas mostradas en la Figura 1 o la Figura 2. O bien el cebador directo o el cebador inverso se marcó con un Ligando 1 (L1), que era reconocible por el Molecular I unido a una enzima (por ejemplo, HRP). Las reacciones de PCR se diseñaron y realizaron para producir los productos que contienen una o más regiones específicas, es decir, las Regiones 1-6 de HLA-B*1502 o las Regiones 1-6 de HLA-B*5801. Se designaron dos oligonucleótidos específicos de secuencia competitivos (CSSO1 y CSSO2). CSSO1 reconoce específicamente una de las regiones 1-6 de HLA-B*1502 o las Regiones 1-6 de HLA-B*5801 y el CSSO2 fue diseñado para cebar el tipo común de HLA-B*15 (es decir, alelos no-B*1502 o no-B*5801). El CSSO1 fue marcado con Ligando 2, que es reconocible por Molecular II recubierto sobre una tira o placa de reacción. Los productos de PCR obtenidos de este modo se hibridaron con los dos CSSO sobre la placa o tira de reacción. Después de lavar cualquier resto de molécula libre, se añadió sustrato de la enzima a la placa de reacción. La reacción enzimática, señalizada por la presencia de un color, es indicativa de la presencia de HLA-B*1502 o HLA-B*5801.

Ejemplo 3. Correlación entre SSJ/NET inducido por CBZ y HLA-B*1502

30 Para este estudio se reclutó a un total de 238 pacientes (mongoloides o descendientes de mongoloides) con RAM en el Chang Gung Memorial Hospital o en otros centros médicos de todo Taiwan. Su historial de consumo de fármacos incluía la dosis y la duración y se registraron los fenotipos de las RAM. Los criterios diagnósticos de la morfología clínica se definieron según Roujeau, J. Invest Dermatol, 102 (6):28S-30S, 1994. Por ejemplo, el SSJ se definió como desprendimiento de la piel de menos de 10 % de la superficie corporal, SSJ-NET superpuestas cuando el desprendimiento de la piel es de 10-30 % y NET cuando es mayor del 30 %. SSJ, SSJ-NET superpuestas y NET se conocen colectivamente como SSJ/NET.

35 Para cada paciente, se suspendió el fármaco sospechoso y se observaron los síntomas del paciente. Se excluyeron a los pacientes que desarrollaron una RAM cutánea que no remitió con la retirada del fármaco.

De acuerdo con los criterios descritos anteriormente, 112 pacientes fueron diagnosticados de SSJ/NET y 126 pacientes tuvieron una reacción de hipersensibilidad más leve a varios medicamentos. Entre los 112 pacientes con SSJ/NET, 42 fueron expuestos a CBZ (Tegretol), 17 habían tomado alopurinol y 53 estaban tomando medicaciones diferentes a CBZ y alopurinol.

40 Se incluyeron como controles 73 pacientes que toleraban Tegretol, también se reclutaron voluntarios de la población general de Taiwán (n = 94, intervalo de edad: 20 a 80 años). El estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional y se obtuvo el consentimiento informado.

45 Todos estos pacientes fueron sometidos a genotipado. En resumen, los reactivos para la realización de un ensayo de transferencia inversa en línea utilizando el oligonucleótido específico de secuencia (SSO) se adquirieron de DYNAL Biotech Ltd. (Bromborough, Reino Unido). Los productos de PCR se generaron utilizando cebadores biotinilados para el segundo y tercer exones de los loci del HLA de clase I o II y a continuación se hibridaron con una transferencia en línea de SSO de sondas inmovilizadas sobre una membrana de nylon. La presencia de producto de PCR biotinilado unido a una sonda específica se detecta usando estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato cromogénico, soluble para producir una "línea" azul en la posición de la sonda positiva. El patrón de reactividad de la sonda fue interpretado por el software de genotipado Dynal RELI™ SSO (DYNAL Biotech Ltd.; Bromborough, Reino Unido). Las posibles ambigüedades se resolvieron además tecleando basándose en la secuencia y la secuenciación del ADN se realizó de acuerdo con el Manual Técnico del IHWG (Grupo de Trabajo Internacional de Histocompatibilidad), ver Genomic Analysis of the Human MHC DNABased Typing for HLA Alleles and Linked Polymorphism. Marcel GJ Tilanus, Editor jefe, ISBN Nº 0-945278-02-0.

55 Para algunos pacientes, se realizó el genotipado de SNP usando la espectrometría de masas MALDI-TOF de alto rendimiento. Brevemente, los cebadores y sondas fueron diseñados utilizando el software SpectroDESIGNER (Sequenom, San Diego, CA, EE.UU.). Se llevaron a cabo múltiples reacciones en cadena de la polimerasa (PCR),

los dNTP no incorporados se desfosforilaron usando la fosfatasa alcalina de camarón de Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza), seguido de la extensión del cebador. La reacción de extensión del cebador purificado se transfirió a un chip de silicio de 384 elementos (SpectroCHIP, Sequenom), se analizó utilizando un espectrómetro de masas Bruker Biflex III MALDI-TOF SpectroREADER (Sequenom) y los espectros se procesaron con un SpectroTYPER (Sequenom).

Las frecuencias alélicas en los diferentes grupos se compararon mediante el procedimiento de Chi-cuadrado con corrección de Yates construyendo tablas de 2x2. Los valores de P se corrigieron para comparaciones de alelos múltiples HLA (P_c) multiplicando los valores P brutos por el número observado de alelos HLA presentes dentro de los loci. La razón de probabilidades se calculó con la modificación de Haldane, que añade 0,5 a todas las células para dar cabida a posibles recuentos cero.

Como se muestra en la Tabla 1, un alelo variante de ADN en el locus HLA-B (HLA-B*1502) se asoció en pacientes con SSJ/NET inducido por fármacos, particularmente en los pacientes que recibieron CBZ (Tegretol).

Tabla 1. Frecuencia de HLA-B*1502 en 42 pacientes taiwaneses que tienen SSJ/NET inducido por CBZ

Alelo	Pacientes N = 42	Controles 1 ^a N = 142	Controles 2 ^b N = 142	Controles 3 ^c N = 73	χ^2	Razón de probabilidades	P _a
B*1502	42 (100 %)	9 (6,3) %			137,28	1,194,47	3,6x10 ⁻³⁰
B*1502	42 (100 %)		5 (5,3 %)		110,919	1383,2	2,15x10 ⁻²⁴
B*1502	42 (100 %)			3 (4,1 %)	98,936	1712	9,1x10 ⁻²²

^a, Pacientes que tuvieron RAM más leves distintas a SJS
^b, Población taiwanesa en general
^c, Pacientes que toleran CBZ
 χ^2 , Chi-cuadrado con corrección de Yates
P_c Calculada multiplicando los valores de P brutos por el número observado de alelos HLA-B (35).

HLA-B*1502 se detectó en 42 de 42 (100 %) pacientes con SSJ/NET que recibieron CBZ. El alelo también se encontró en 17 de 53 (32 %) de pacientes con SSJ/NET que recibieron otros fármacos (8 fenitoína, 2 alopurinol, 2 amoxicilina, 1 sulfasalazina, 1 ketoprofeno, 1 ibuprofeno y 2 fármacos desconocidos). En concreto, 8 de 17 pacientes (47,05 %) que desarrollaron SSJ/NET después de tomar fenitoína también eran portadores del alelo HLA-B*1502. Por otro lado, el alelo solo se encontró en 4,1 % (3/73) del grupo que toleraba CBZ, 0 % (0/32) del grupo que toleraba fenitoína, 6,3 % (9/142) de los pacientes que tenían RAM más leves distintas al SSJ y 5,3 % (5/94) de la población general. Al utilizar el grupo con tolerabilidad como control, la razón de probabilidades, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo para B*1502 asociado a SSJ/NET inducido por CBZ, fue 1712, 1,00 %, 95,89 %, 96,0 % y 100 %, respectivamente. Con un valor predictivo y sensibilidad tan altos, la tipificación de este alelo HLA-B se puede utilizar para identificar pacientes de alto riesgo de SSJ/NET inducido por fármacos, particularmente SSJ/NET inducido por CBZ o fenitoína.

Se vio que las RAM leves inducidas por CBZ estaban asociadas con otro alelo, HLA-B*4601. 10 de 16 (62,5 %) de los pacientes con estas reacciones más leves a CBZ tenían HLA-B*4601. Por el contrario, el alelo sólo se encontró en 26 % (19/73) del grupo que toleraba CBZ. La razón de probabilidades para B*4601 asociado a RAM cutáneas más leves inducidas por CBZ era 4,73. Por consiguiente, HLA-B*4601 se puede utilizar en la evaluación del riesgo de RAM cutánea leve inducida por CBZ.

Tabla 2. Datos del fenotipo/genotipo de los pacientes que tienen RAM cutáneas inducidas por CBZ

ID	Fármaco sospechoso	Fenotipo	Genotipo HLA-B
1	Carbamazepina	SSJ	B*1502/3802
2	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*3501
3	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4006
4	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*3802
5	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*3802
6	carbamazepina, fenitoína	SSJ	B*1502/B*3802
7	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4001
8	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*3901
9	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*5801
10	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*5801

ES 2 422 735 T3

11	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*1525
12	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4002
13	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4006
14	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*5801
15	Carbamazepina	SSJ/NET superpuestas	B*1301/B*1502
16	Carbamazepina	SSJ/NET superpuestas	B*1502/B*3501
17	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*3802
18	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4601
19	Carbamazepina	SSJ	B*1301/B*1502
20	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*5801
21	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4601
22	Carbamazepina, AINE	SSJ	B*1502
23	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*3501
24	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4601
25	Carbamazepina	SSJ	B*502/B*4601
26	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*5801
27	Carbamazepina	SSJ	B*1501/B*1502
28	Carbamazepina	SSJ	B*1502/B*4001
29	Carbamazepina	SSJ	B*1502
30	carbamazepina, meloxicam, sulindac, fenitoína	SSJ	B*1502/B*5801
31	Carbamazepina	SSJ	B*1502/4601
32	Carbamazepina	SSJ	B*1502/5801
33	Carbamazepina	SSJ	B*1502/4601
34	Carbamazepina	SSJ	B*1502/5502
35	Carbamazepina	SSJ	B*1502
36	carbamazepina, fenitoína	SSJ	B*1502/4002
37	Carbamazepina	SSJ	B*1502/4001
38	Carbamazepina	SSJ	B*1502
39	Carbamazepina, fenitoína	SSJ	B*1502
40	Carbamazepina	SSJ/NET superpuestas	B*1502/4001
41	Carbamazepina	SSJ/NET superpuestas	B*1502/4601
42	Carbamazepina	SSJ	B*1502/3802
43	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*5801/B*4601
44	Carbamazepina	eritema multiforme	B*400/B*4601
45	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*1301/B*4001
46	Carbamazepina	Y angioedema	B*4601/B*5401
47	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*4001/B*4601
48	Carbamazepina, AINE	exantema maculopapular	B*4001/B*4001
49	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*1301/B*5502
50	Carbamazepina	hinchazón labial, úlcera oral y genital	B*4601/B*5801
51	Carbamazepina	Maculopapular	B*4601/B*5801
52	Carbamazepina	Y angioedema	B*4001
53	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*4001/B*5101
54	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*1301/4001
55	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*4001/B*4601
56	Carbamazepina	eritema multiforme	B*4601/B*5401

57	Carbamazepina	exantema maculopapular	B*4601
58	Carbamazepina	eritema multiforme	B*4601/5101

Ejemplo 4. Correlación entre SSJ/NET inducido por alopurinol y HLA-B*5801

Se vio que HLA-B*5801 se asociaba con SSJ/NET inducido por alopurinol. Este alelo HLA-B se encontró en los 17 (100 %) pacientes con SSJ/NET intensa tratados con alopurinol (Tablas 3 y 4), aunque sólo se encontró en el 18 % de la población taiwanesa general (razón de probabilidades 155, sensibilidad 100 %, especificidad 82 %, valor predictivo positivo 84,7 %, un valor predictivo negativo 100 %, $P_c = 3,7 \times 10^{-9}$). Estos resultados sugieren que el HLA-B*5801 es un marcador genético útil, ya sea solo o en combinación con otros marcadores genéticos, para evaluar si un paciente que toma alopurinol tiene riesgo de desarrollar SSJ/NET.

Tabla 3. Frecuencias de HLA-B*5801 en 17 pacientes taiwaneses con RAM cutáneas intensas inducidas por alopurinol

Alelo	Pacientes n = 17	Controles 1 ^a n = 142	Controles 2 ^b n = 94	χ^2	Razón de probabilidades	P_c
B*5801	17 (100 %)	26 (18,3 %)		47,2	153,86	$2,1 \times 10^{-10}$
B*5801	17 (100 %)		17 (18,0 %)	41,7	155	$3,7 \times 10^{-9}$

^a, Pacientes que tuvieron RAM distintas a RAM cutáneas inducidas por alopurinol

^b, Población taiwanesa en general

χ^2 , Chi-cuadrado con corrección de Yates

P_c Calculada multiplicando los valores de P brutos por el número observado de alelos HLA-B (35).

Tabla 4. Datos del fenotipo/genotipo de los pacientes con RAM cutáneas inducidas por alopurinol

Identificación del paciente	Fármaco sospechoso	Fenotipo	Genotipo HLA-B
59	alopurinol	SSJ	B*0705/B*5081
60	alopurinol	SSJ	B*4001/B*5801
61	alopurinol	SSJ	B*1554/B*5801
62	alopurinol	SSJ	B*3901/B*5801
63	alopurinol	SSJ	B*5801
64	alopurinol	SSJ	B*3901/B*5801
65	alopurinol	SSJ	B*3901/B*5801
66	alopurinol	SSJ	B*4001/B*5801
67	alopurinol	SSJ	B*1502/B*5801
68	alopurinol	SSJ	B*4001/B*5801
69	alopurinol	SSJ y vasculitis en la pierna	B*4601/B*5801
70	alopurinol	SSJ y liquenoide	B*4001/B*5801
71	alopurinol	SSJ	B*4002/B*5801
72	alopurinol	SSJ	B*4001/B*5801
73	alopurinol	SSJ	B*5101/B*5801
74	alopurinol	NET	B*1301/5801
75	alopurinol	SSJ	B*5801

Ejemplo 5. Correlación entre HLA-B*5801 y SHS inducido por haloperidol

También se vio que HLA-B*5801 estaba asociado al SHS inducido por alopurinol, que incluye exantema cutáneo (por ejemplo, maculopapular difuso, dermatitis exfoliativa), fiebre, eosinofilia, linfocitos circulantes atípicos, leucocitosis, daño hepatocelular agudo o agravamiento de la función renal (Arellano et al., Ann. Pharmacother., 27:337, 1993).

Se estudiaron 31 pacientes, entre los cuales 21 tenían SSJ, 3 SSJ/NET, 1 NET y 15 SHS. En todos los casos descritos, alopurinol era considerado como el fármaco responsable si la aparición de síndromes de tipo RAM se producían en los 2 meses siguientes a la exposición a alopurinol y los síntomas de RAM desaparecían tras la

retirada del fármaco. Se excluyeron a los pacientes con cualquiera de las siguientes características: ausencia de síntomas después de la reexposición a alopurinol y pacientes con erupción cutánea leve que no cumplían los criterios de SHS, SSJ o NET.

5 El inicio de los síntomas del SHS en los 31 pacientes se produjo en los 2 primeros meses después de la exposición a alopurinol y 2 pacientes tuvieron un segundo episodio a los 2 días de la re-exposición a alopurinol. Doce pacientes recibieron otro fármaco(s), además de alopurinol, pero sus historias clínicas revelaron que no se producían RAM cuando se tomaban estas medicaciones concomitantemente sin alopurinol. Todos los pacientes tenían hiperuricemia y/o artritis gotosa, así como otras enfermedades crónicas, incluyendo hipertensión (14/31), enfermedad renal crónica (16/31) y diabetes (9/31).

10 Noventa y ocho pacientes con artritis gotosa que habían estado recibiendo alopurinol durante al menos 6 meses (media = 38 meses, intervalo = 6-107 meses) sin síndromes de RAM se incluyeron como control con tolerabilidad a alopurinol. La distribución por sexo del grupo con tolerabilidad es comparable a la prevalencia general de la gota en la población china. Además, 93 sujetos normales sirvieron como grupo de control normal. Las variables demográficas de estos 3 grupos se muestran en la Tabla 5.

15 **Tabla 5. Variables demográficas, dosis y duración de la exposición a alopurinol en pacientes con RAM intensas, pacientes con tolerabilidad, así como los sujetos normales**

	RAM intensas (n = 31)	Con tolerancia (n = 98)	Sujetos normales (n = 93)
Sexo			
Masculino	12	89	52
Femenino	19	9	41
Edad (años)			
Mediana (intervalo)	57,9 (18-91)	57,3 (21-84)	53,9 (22-91)
Dosis de alopurinol (mg/día)			
Mediana (intervalo)	143,3 (50-300)	159,2 (100-400)	Ninguno
Duración de la exposición a alopurinol			
Mediana (intervalo)	28,2 días (1-56)	38 meses (6-107)	Ninguno

20 El alelo HLA-B*5801 estaba presente en los 31 (100 %) de los pacientes que habían sufrido RAM intensas inducidas por alopurinol, en 16 (16,3 %) de los 98 pacientes con tolerabilidad a alopurinol (razón de probabilidades 315, $P_c < 10^{-15}$) y en 19 (20 %) de los 93 sujetos normales (razón de probabilidades 241, $P_c < 10^{-13}$). Respecto al grupo con tolerabilidad a alopurinol, la ausencia de HLA-B*5801 tuvo un valor predictivo negativo de 100 % para las RAM inducidas por alopurinol y la presencia de este alelo tuvo un valor predictivo positivo del 66 %. Por consiguiente, HLA-B*5801 es un marcador útil con una alta especificidad (84 %) y sensibilidad (100 %) para las RAM intensas inducidas por alopurinol. Las RAM incluían RAM cutáneas (por ejemplo, SSJ/NET o SHS) y DRESS (reacción farmacológica con eosinofilia y síntomas sistémicos) inducida por alopurinol.

25 **Ejemplo 6. Marcadores genéticos equivalentes a HLA-B*1502 y HLA-B*5801**

Los marcadores genéticos cercanos a un alelo de HLA de interés tienden a co-segregar, o mostrar un desequilibrio de ligamiento con el alelo de interés. Como resultado de ello, la presencia de estos marcadores (marcadores genéticos equivalentes) es indicativa de la presencia del alelo.

30 Para determinar la incidencia de posibles marcadores genéticos equivalentes en pacientes con RAM, se determinaron varios marcadores en el haplotipo HLA-B*1502 por su asociación con RAM. En efecto, los marcadores HLA del haplotipo HLA-B*1502, tales como DRB1*1202, Cw*0801, Cw*0806, A*1101 y MICA*019, tuvieron una frecuencia significativamente alta en pacientes con SSJ/NET que habían estado expuestos a CBZ (Tabla 6).

35 También se determinaron los marcadores asociados con HLA-B*5801. La distribución de los alelos se analizó en 4 pacientes que eran homocigotos para HLA-B*5801 y se definió que el haplotipo ancestral de este alelo incluía HLA-A*3303, Cw*0302, B*5801 y DRB1*0301. Este haplotipo ancestral estaba presente en 12 (38,7 %) de los 31 pacientes con RAM inducida por alopurinol (Tabla 7), pero solo en el 7,1 % de los pacientes con tolerancias y en el 9,7 % de los sujetos normales.

Tabla 6. Correlación entre los haplotipos ancestrales de los marcadores de B*1502 y RAM

	CBZ SSJ/NET (n = 42)	CBZ más leve (n = 16)	CBZ Con tolerabilidad (n = 73)	Alopurinol SSJ/NET (n = 17)	Población general (n = 94)
HLA-B*1502	42 (100 %)	0 (0 %)	3 (4,1 %)	1 (5,8 %)	5 (5,3 %)
HLA-Cw*0801	38 (90 %)	ND	10 (13,7 %)	2 (11,7 %)	10 (10,6 %)
HLA-Cw*0806	3 (7,1 %)	ND	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
HLA-A*1101	31 (73,8 %)	ND	ND	ND	28 (29,8 %)
HLA-DRB1*1201	35 (83,3 %)	ND	ND	ND	19 (20,2 %)

Tabla 7. Frecuencias de los loci individuales o combinados del haplotipo ancestral de NLA-B*5801 en pacientes con RAM intensas inducidas por alopurinol, pacientes con tolerabilidad a alopurinol y en sujetos normales

	RAM-alopurinol (n = 31)	Tolerabilidad a alopurinol (n = 98)	Sujetos normales (n = 93)
B*5801	31 (100 %)	16 (16,3 %) ¹	19 (20,4 %) ²
Cw*0.302	29 (93,5 %)	1,5 (17,3 %)	19 (20,4 %)
A*3303	20 (64,5 %)	18 (18,4 %)	20 (21,5 %)
DRB1*0301	21 (67,7 %)	14 (14,3 %)	14 (15,1 %)
B*5801, Cw*0302	29 (93,5 %)	15 (15,3 %)	19 (20,4 %)
B*5801, Cw*0302, A*3303	20 (64,5 %)	13 (13,3 %)	16 (17,2 %)
B*5801, Cw*0302, DRB1*0301	19 (61,3 %)	9 (9,2 %)	10 (10,8 %)
B*5801, Cw*0302, A*3303, DRB1*0301	12 (38,7 %)	7 (7,1 %)	9 (9,7 %)

¹Razón de probabilidades (RAM/Tolerabilidad a alopurinol): 315 (IC 95 %, 18,3-5409,5), $p_c = 7,5 \times 10^{-16}$.
²Razón de probabilidades (RAM/Normales a alopurinol): 241 (IC 95 %, 14,1-4,111), $p_c = 6,1 \times 10^{-13}$.

5 Los marcadores MHC asociados con HLA-B*5801 también se determinaron mediante análisis de polimorfismos de repetición en tándem corto (GECT). Brevemente, veinte marcadores microsatélite altamente polimórficos localizados en la región MHC se seleccionaron de la base de datos NCBI (es decir, D6S258, D6S2972, D6S510, D6S265, D6S388, D6S2814, HLAC_CA1, HLABC_CA2, MIB, MICA, TNFd, BAT2_CA, D6S273, D6S1615, DQCAR, G51152, D6S2414, D6S1867, D6S1560 y D6S1583). La heterocigosidad promedio de estos marcadores fue de 0,72 con un espaciado estimado de 230 kb.

10 Los cebadores se diseñaron basándose en las secuencias de estos marcadores descritas en la base de datos. Las PCR se llevaron a cabo para amplificar y detectar la presencia o ausencia de estos marcadores en pacientes utilizando termocicladores GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) (en un volumen de 5 µl que contiene 10 ng de ADN genómico y 0,33 µM de cada cebador). Se combinaron hasta 6 productos de PCR con tamaños adecuados y que presentaban señales fluorescentes antes de la electroforesis en gel capilar. El tamaño de los amplicones polimórficos se determinó por electroforesis del secuenciador de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems), utilizando el patrón de tamaño LIZ500 como patrón de tamaño interno (Applied Biosystems). La medición del alelo se realizó utilizando el programa GENMAPPER versión 3.0 (Applied Biosystems). La categorización de los alelos se realizó con el programa SAS. Se incluyeron tres individuos control CEPH (1331-01, 1331-02, 1347-2) y se incluyeron H2O en todos los experimentos de genotipado para el control de calidad.

15 Un bloque de alelo situado entre HLA-C y TNF-d se encontró en el grupo de pacientes con RAM inducida por alopurinol, pero no en el grupo con tolerancia a alopurinol, usando un gráfico de desequilibrio de ligamiento. En este bloque, se identificó un haplotipo (MIB*358-MICA*206-TNFd*140) cercano al alelo HLA-B. La asociación de este haplotipo con las RAM es concordante con la asociación de HLA-B*5801 con las mismas RAM ($p = 0,0018$).
 25 Mediante el uso de marcadores GECT y la secuenciación del alelo MICA, se vio que todos los pacientes con RAM inducidas por alopurinol eran portadores del mismo alelo B (B*5801), alelo MICA (MICA*00201) y el marcador TNF GECT (TNFd*140). Salvo en un caso, también se vio que todos los demás eran portadores del mismo marcador MIB (MIB*358).

Ejemplo 7. Reactividad cruzada de linfocitos T reactivos a CBZ con oxcarbazepina y licarbazepina

30 Dos pacientes con SSJ/NET inducido por CBZ fueron reclutados del Chang Gung Memorial Hospital. Uno de los pacientes era portador de HLA-B*1502/B*4601 y el otro de HLA-B*1502/B*5101. Los ADN genómicos fueron extraídos de los pacientes usando el sistema de purificación de ADN PUREGENE (Gentra systems, Minnesota,

EE.UU.). Los alelos HLA-B se verificaron por medio de transferencias de línea inversa de oligonucleótidos específicos de secuencia (DYNAL Biotech Ltd., Bromborough, Reino Unido).

5 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los pacientes por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Isopaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ). Una parte de las CMSP fueron transformadas por el virus de Epstein-Bar para establecer líneas de linfocitos B autólogas.

10 Los linfocitos T reactivos a CBZ se amplificaron como se describe a continuación, las CMSP preparadas de los pacientes se cultivaron en un medio RPMI completo que contiene un 10 % de suero humano inactivado por calor, IL-2 (25 U/ml) y CBZ (25 µg/ml) (Sigma) en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C durante 7 días. Los linfocitos T se amplificaron después mediante co-cultivo con linfocitos B irradiados (50 Gy) autólogos en la presencia de CBZ durante 10 días. Después de 2 ciclos del procedimiento de co-cultivo anterior, se recogieron los linfocitos T activados por CBZ y se sometieron a ensayos de ELISPOT (eBioscience).

15 Los linfocitos T reactivos a CBZ se ensayaron para determinar su reactividad cruzada con compuestos, por ejemplo, CBZ10, 11-epoxi, oxcarbazepina (nombre de la marca: Trileptal), licarbazepina y sulindac. En resumen, los linfocitos T (5×10^3 células) se mezclaron con linfocitos B autólogos (5×10^4 células) en 200 µl de medio RPMI que contiene un 10 % de FBS en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo. Las células se incubaron a continuación durante 24 horas en los pocillos de una placa ELISPOT recubiertos con anticuerpos anti-interferón γ (Millipore). Después de la incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo celular y el interferón γ contenido en los mismos se detectó utilizando procedimientos mediados por anticuerpos conocidos en la técnica.

20 Los resultados de este estudio indican que los linfocitos T reactivos a CBZ mostraban reacción cruzada con CBZ 10, 11-epóxido, oxcarbazepina y licarbazepina, pero no con sulindac.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar, en un paciente humano, el riesgo a desarrollar una reacción adversa a un medicamento en respuesta a un fármaco, que comprende
5 detectar la presencia de HLA-B*1502 en una muestra obtenida del paciente y correlacionar la presencia de HLA-B*1502 en la muestra con un riesgo aumentado de desarrollo de una reacción adversa a un medicamento en el paciente en respuesta al fármaco, en el que la reacción adversa a un medicamento es el síndrome de Stevens-Johnson o necrólisis epidérmica tóxica y el fármaco es oxcarbazepina o licarbazepina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fármaco es oxcarbazepina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fármaco es licarbazepina.
- 10 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que la muestra obtenida del paciente es una muestra de ADN.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la presencia del alelo de HLA se determina mediante hibridación con un oligonucleótido que se hibrida específicamente con el alelo.
- 15 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la muestra obtenida del paciente es una muestra de ARN o una muestra de proteína.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la muestra se obtiene de sangre periférica, saliva, orina o de cabello del paciente.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la reacción adversa a un medicamento es el síndrome de Stevens-Johnson.
- 20 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la reacción adversa a un medicamento es necrólisis epidérmica tóxica.

HLA-B*1502⁰² exón 2+3-546 pb

unión

intrón-245 pb

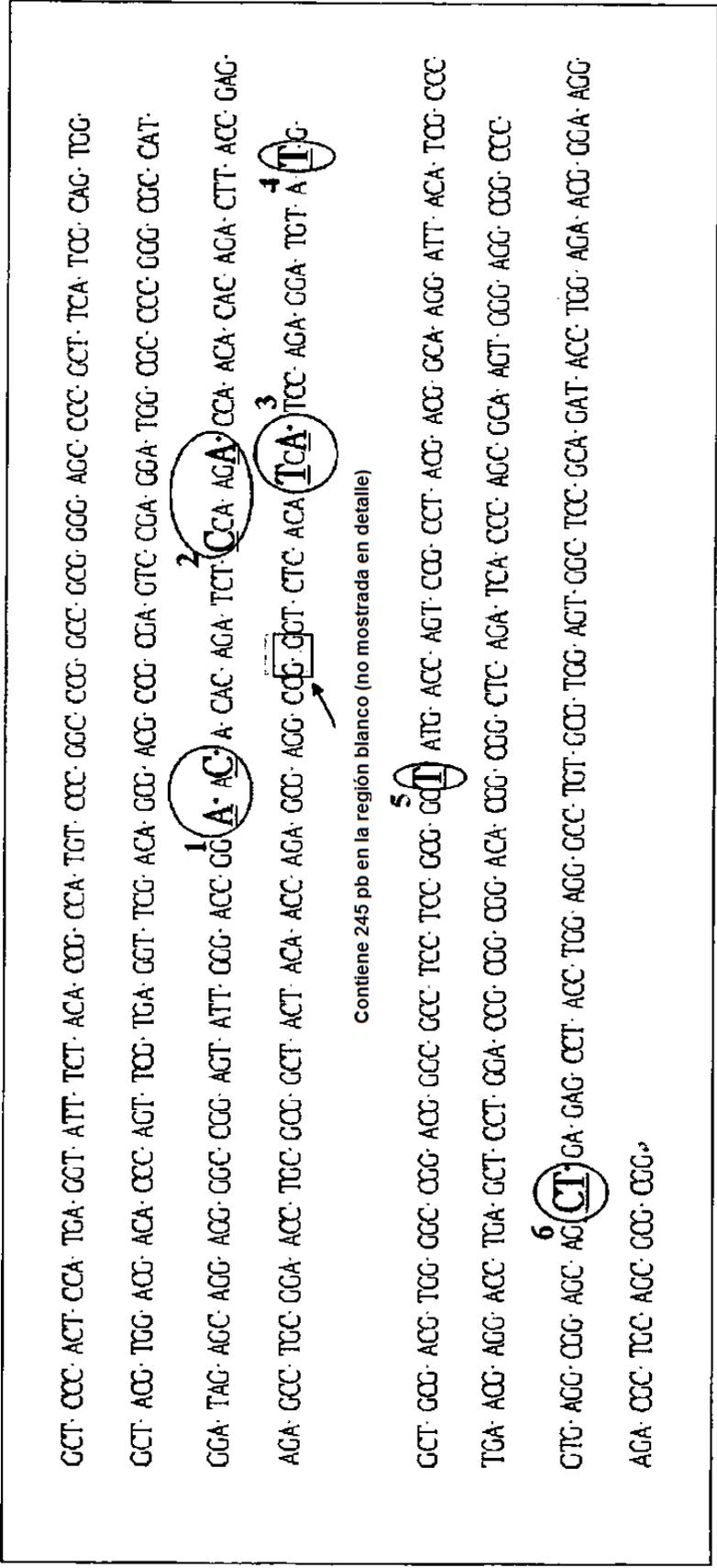


Figura 1

HLA-B*5801⁰⁰² exón 2+3: 546 pb unión intrón :245 pb

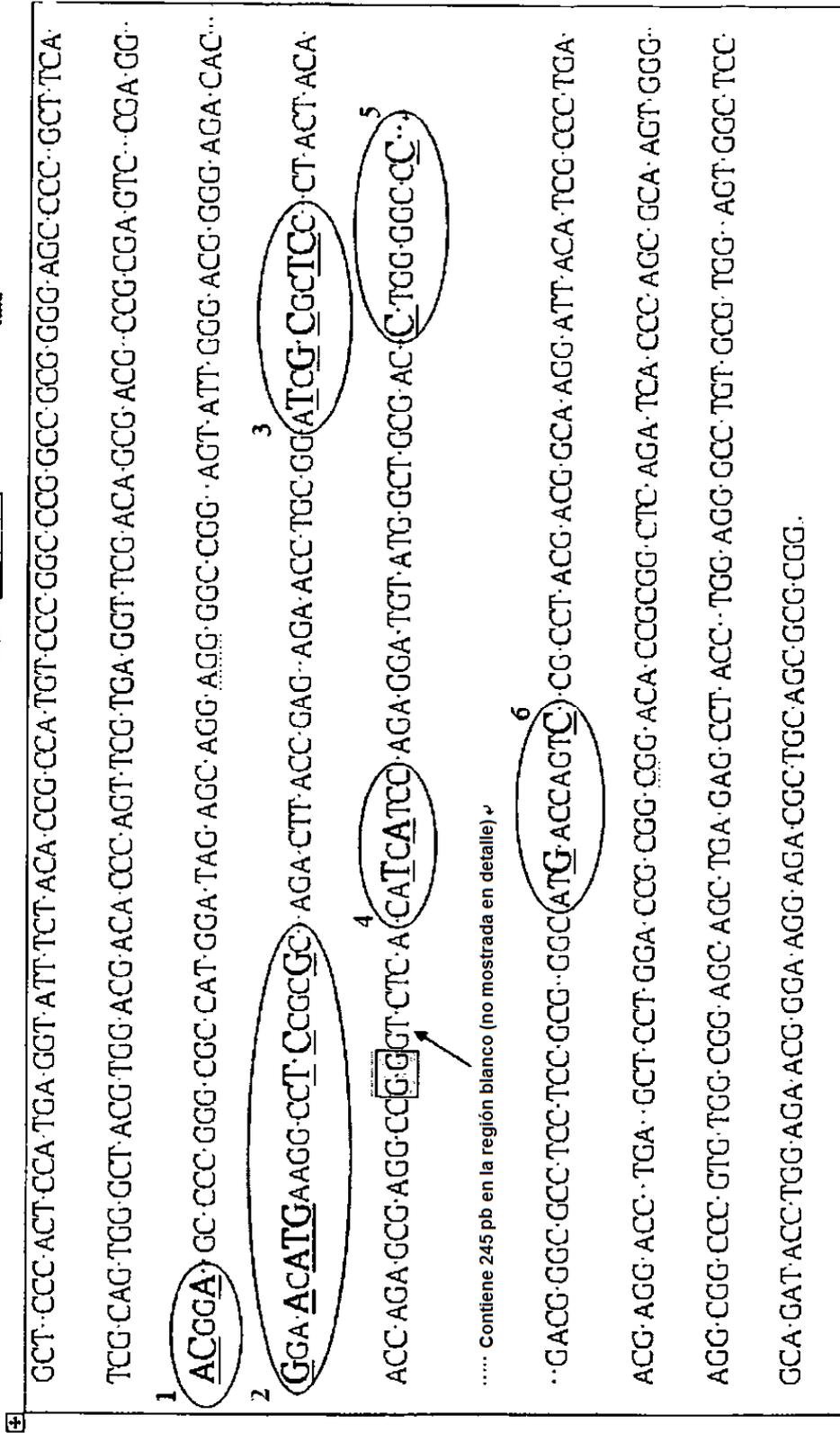


Figura 2

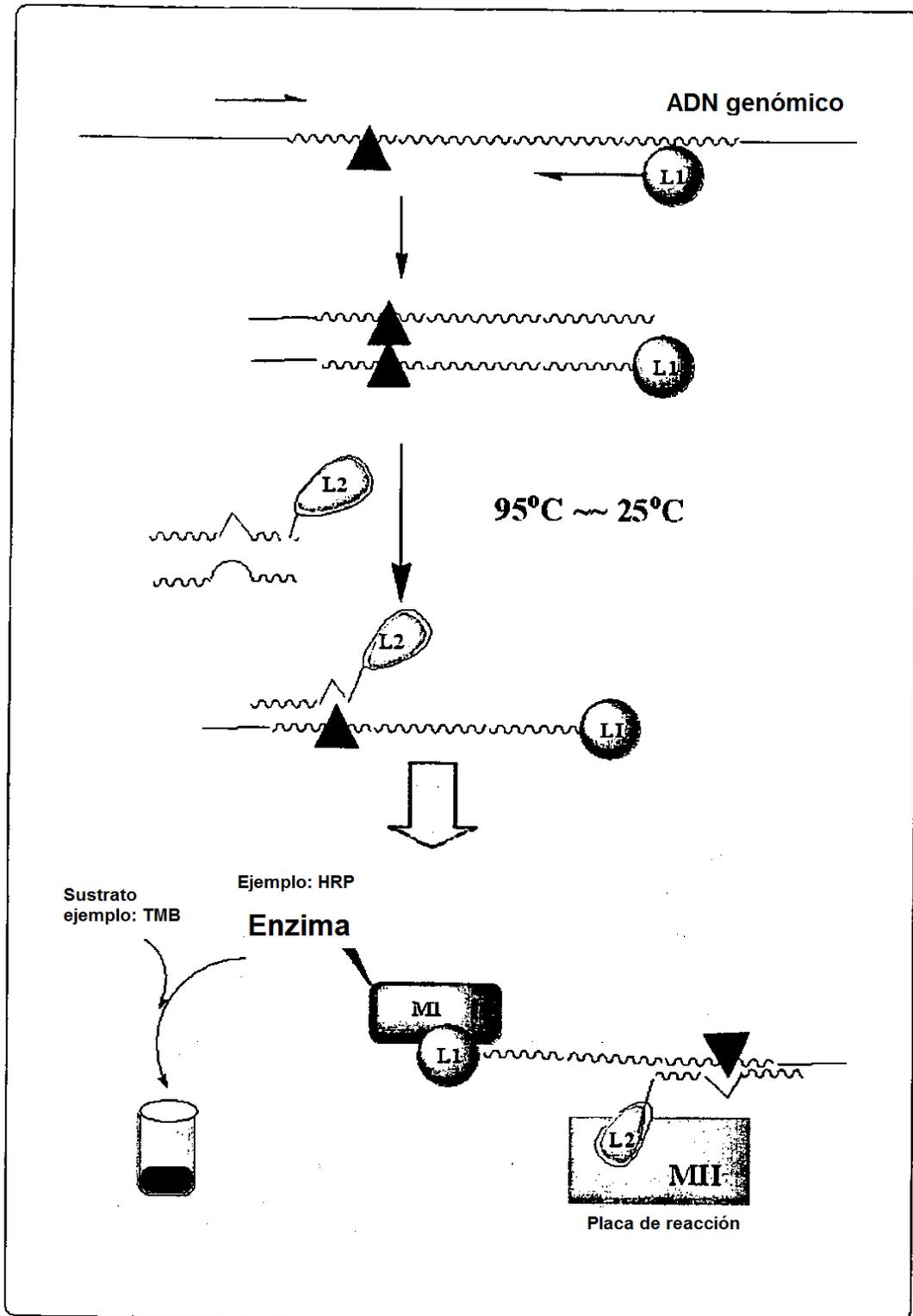


Figura 3