

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 115**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2002 E 02756990 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1427849**

54 Título: **Método de cribado para la reacción de hipersensibilidad a un fármaco**

30 Prioridad:

21.08.2001 US 314026 P

30.10.2001 US 336850 P

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

11.10.2013

73 Titular/es:

**VIIV HEALTHCARE UK LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**HETHERINGTON, SETH;
HUGHES, ARLENE R;
LAI, ERIC H;
MOSTELLER, JR. MICHAEL y
SHORTINO, DENISE D**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 425 115 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

Método de cribado para la reacción de hipersensibilidad a un fármaco

Antecedentes

5 Las reacciones de hipersensibilidad (HSR) son reacciones inesperadas de tipo inmunológico (alergia) que aparecen en una minoría de pacientes tratados con terapia antirretrovírica. No se ha descubierto ningún síntoma ni ensayo de laboratorio que prediga o diagnostique dichos acontecimientos. Los síntomas habituales, que aparecen en combinaciones, incluyen fiebre, sarpullidos, reacciones gastrointestinales, fatiga severa y síntomas respiratorios. Estas reacciones de hipersensibilidad constituyen una entidad clínica diferenciada y no son los simples sarpullidos (sarpullidos suaves sin síntomas sistémicos) que son reacciones habituales a muchos fármacos. Las reacciones de hipersensibilidad se solucionan cuando se deja de tomar el fármaco causante, pero vuelven cuando se reinicia la toma. El mecanismo exacto de las reacciones de hipersensibilidad es desconocido.

15 La terapia antirretrovírica ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o diagnosticados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La terapia con combinaciones de agentes antirretrovíricos puede prolongar la supervivencia y disminuir el riesgo de complicaciones de la infección por VIH-1. Pueden producirse reacciones adversas con cualquier agente antirretrovírico, algunas de las cuales con el potencial de provocar grave morbilidad y mortalidad (véase, por ejemplo, Samuel *et al.*, *Antiretroviral Therapy*, 2000, Arch. Pharm. Res., 23:425 (2000); Carr *et al.*, *Lancet*, 356:1423 (2000)). Las reacciones adversas habituales, y normalmente menos graves, incluyen náuseas, dolor de cabeza, fatiga, diarrea, y sarpullidos no severos en la piel. Las reacciones adversas menos habituales, pero a veces graves, frente a los agentes antirretrovíricos incluyen sarpullidos severos en la piel, pancreatitis, acidosis láctica, y reacciones de hipersensibilidad.

25 Se ha indicado que aparecen reacciones de hipersensibilidad al abacavir (Ziagen) en aproximadamente 5% de los pacientes que reciben este agente solo o en combinación con otros agentes antirretrovíricos (nótese que el Ziagen está indicado para el tratamiento de la infección por VIH-1 en combinación con otros agentes antirretrovíricos). El cese de la toma de abacavir conduce a la resolución de los síntomas de la reacción de hipersensibilidad. La administración continuada de abacavir ante una reacción en curso o la reintroducción de abacavir en pacientes con una historia anterior de reacción puede producir una reacción súbita, grave y potencialmente mortal.

Un ensayo de cribado para identificar los sujetos que tienen un mayor riesgo de presentar una reacción de hipersensibilidad frente a un compuesto farmacéutico sería útil en la medicina clínica.

30 Sumario de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es un método para identificar genotipos que confieren una mayor o menor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir en sujetos humanos. En una población de sujetos de ensayo, cada sujeto se genotipifica para detectar polimorfismos en un gen candidato, tal como el gen TNFalfa (TNF α), MICA, MICB y/or los genes HLA. Se administra un régimen terapéutico de abacavir a cada sujeto (antes, al mismo tiempo o después de la genotipificación del sujeto), y se identifican los sujetos de ensayo que muestran (o mostraron) señales clínicas de una reacción de hipersensibilidad al abacavir. Los genotipos de los sujetos de ensayo en los sitios polimórficos en los genes candidatos se correlacionan con la aparición de señales clínicas de reacción de hipersensibilidad, para determinar cuáles son los genotipos asociados con un mayor o menor riesgo de una reacción de hipersensibilidad (comparado con otros genotipos o con una población general que no haya sido estratificada según el genotipo).

Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar si un individuo tiene un mayor riesgo de sufrir una reacción de hipersensibilidad al abacavir, determinando si el individuo tiene un genotipo que está asociado con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad, comparado con el riesgo en sujetos con otros genotipos.

45 Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar si un individuo tiene un menor riesgo de sufrir una reacción de hipersensibilidad al abacavir, determinando si el individuo tiene un genotipo que está asociado con un menor riesgo de una reacción de hipersensibilidad, comparado con el riesgo en sujetos con otros genotipos.

Otro aspecto de la presente invención es un método de cribado de un sujeto humano como ayuda para evaluar la idoneidad de la administración de abacavir, determinando si el sujeto tiene un genotipo de TNF α que ha sido asociado con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad frente al abacavir, comparado con el riesgo en sujetos con otros genotipos de TNF α . La presencia de dicho genotipo de TNF α indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir.

55 Otro aspecto de la presente invención es un método de cribado de un sujeto humano como ayuda para evaluar la idoneidad de la administración de abacavir, determinando si el sujeto tiene un genotipo de HLA que ha sido asociado con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad frente al abacavir, comparado con el riesgo en sujetos con otros genotipos de HLA. La presencia de dicho genotipo de HLA indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir.

También se describe un método para tratar a un sujeto humano con abacavir, genotipificando en primer lugar el sujeto para detectar la presencia o la ausencia del alelo HLA-B57, y después administrando abacavir si no se detecta el alelo HLA-B57.

5 Otro aspecto de la presente invención es un método de cribado de un sujeto humano, como ayuda para predecir el riesgo del sujeto de sufrir una reacción de hipersensibilidad a un régimen terapéutico de abacavir, genotipificando una muestra de ADN del sujeto para determinar la presencia de un polimorfismo en el gen TNF α , en el que el polimorfismo ha sido previamente asociado con un mayor riesgo de HSR al abacavir, comparado con el riesgo de HSR asociado con otros polimorfismos de TNF α . La detección de la presencia de un genotipo de TNF α que se ha asociado con una mayor incidencia de reacciones de hipersensibilidad al abacavir (comparado con la incidencia de HSR al abacavir asociada a otros genotipos de TNF α) indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir.

15 Otro aspecto de la presente invención es un método de cribado de un sujeto humano, como ayuda para predecir el riesgo del sujeto de sufrir una reacción de hipersensibilidad a un régimen terapéutico de abacavir, genotipificando una muestra de ADN del sujeto para determinar la presencia de un polimorfismo en un gen HLA, en el que el polimorfismo ha sido previamente asociado con un mayor riesgo de HSR al abacavir, comparado con el riesgo de HSR asociado con otros polimorfismos. La presencia de un genotipo de HLA que se ha asociado con una mayor incidencia de reacciones de hipersensibilidad al abacavir (comparado con la incidencia de HSR al abacavir asociada a otros genotipos de HLA) indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir.

20 También se describe un método para identificar genotipos humanos asociados con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir, mediante la genotipificación de cada miembro de una población de sujetos de ensayo para al menos un polimorfismo en el gen TNF α , la administración de un régimen terapéutico de abacavir a cada sujeto de ensayo, y la identificación de los sujetos de ensayo que muestran señales clínicas de una reacción de hipersensibilidad al abacavir. La correlación de los genotipos de TNF α con la aparición de señales clínicas de una reacción de hipersensibilidad determinará cuáles son los genotipos asociados con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir (comparado con los otros genotipos detectados).

25 También se describe un método para identificar genotipos humanos asociados con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir, mediante la genotipificación de cada miembro de una población de sujetos de ensayo para al menos un polimorfismo en el gen HLA, la administración de un régimen terapéutico de abacavir a cada sujeto de ensayo, y la identificación de los sujetos de ensayo que muestran señales clínicas de una reacción de hipersensibilidad al abacavir. La correlación de los genotipos de HLA con la aparición de señales clínicas de una reacción de hipersensibilidad determinará cuáles son los genotipos asociados con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir (comparado con los otros genotipos detectados).

30 Otro aspecto de la presente descripción es un método para administrar o recetar abacavir para reducir la aparición de una reacción de hipersensibilidad al abacavir. El método comprende seleccionar, basándose en el estado del genotipo, una población de tratamiento a partir de una población de sujetos inicial mayor que tienen un trastorno adecuado para un tratamiento con abacavir. La población de tratamiento se selecciona para aumentar el porcentaje de sujetos en la población de tratamiento que tienen un genotipo que se ha asociado con un menor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir (el mayor porcentaje de sujetos en la población de tratamiento es con relación al porcentaje de sujetos en la población inicial). Como alternativa, la población de tratamiento se selecciona para disminuir el porcentaje de sujetos en la población de tratamiento que tienen un genotipo que se ha asociado con un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir. Entonces el abacavir se administra a la población de tratamiento seleccionada, reduciendo con ello la incidencia de HSR al abacavir en la población tratada, comparado con la incidencia que se habría esperado que se produjese si el abacavir hubiera sido administrado en la población inicial mayor. El "cribado" puede producirse mediante cualquier proceso adecuado, como será evidente para los expertos en la técnica. Los ejemplos de métodos de cribado adecuados incluyen el cribado genética de los individuos de la población inicial, o clasificando de otra forma los sujetos según el genotipo (por ejemplo, cuando se conoce el genotipo de un sujeto, no es necesario repetir el ensayo genético); o regular de otra forma el acceso al abacavir para disminuir el número de sujetos en la población de tratamiento que tienen genotipos que se han asociado con un mayor riesgo de HSR al abacavir. Uno de estos genotipos es el alelo HLA-B57, con el que la población de tratamiento se seleccionará para minimizar la aparición del alelo HLA-B57 en la población de tratamiento. Como alternativa, el genotipo de interés puede ser el polimorfismo TNF G(-237)A, con lo que la población de tratamiento se seleccionará para minimizar la aparición del alelo A.

Análisis detallado

55 La terapia antirretrovírica en pacientes infectados con VIH a menudo comprende el uso de múltiples tipos de agentes antirretrovíricos, incluyendo inhibidores de proteasas, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos (NNRTI) e inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos (NRTI). El abacavir es un análogo de nucleósido de purina que está disponible en el mercado como sulfato de abacavir (ZIAGEN®, GlaxoSmithKline), y se usa en combinación con otros agentes antirretrovíricos para tratar a sujetos infectados por VIH. El abacavir es un inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH-1 (NRTI) que contiene un anillo de ciclopenteno insaturado en lugar del 2'-

desoxirribósido de los desoxinucleósidos naturales, y contiene un grupo ciclopropilamino. El nombre químico del sulfato de abacavir es sulfato de (cis)-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9H-purin-9-il]-2-ciclopenten-1-metanol (sal) (2:1).

5 Las reacciones de hipersensibilidad son acontecimientos idiosincráticos de una supuesta naturaleza inmunológica que aparecen con una amplia gama de compuestos farmacológicos. En el contexto de la administración de abacavir, las reacciones de hipersensibilidad al abacavir pueden ser graves y avanzar hasta poner en riesgo la vida (Clay *et al.*, Ann. Pharmacotherapy, 34(2):247 (2000); Staszewski *et al.*, AIDS, 12:F197 (1998)). En ensayos clínicos, la hipersensibilidad al abacavir se ha producido en aproximadamente 5% de los sujetos. Las señales y los síntomas de una reacción de hipersensibilidad al abacavir incluyen, pero no se limitan a fiebre, sarpullidos en la piel, fatiga, 10 síntomas gastrointestinales (que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal), y síntomas respiratorios (que incluyen faringitis, disnea y tos). Otras señales y síntomas incluyen malestar, mialgia, miolisis, artralgia, edema, dolor de cabeza y parestesia. Los resultados físicos incluyen linfadenopatía, lesiones en membranas mucosas (conjuntivitis y úlceras bucales). El sarpullido asociado con la reacción de hipersensibilidad normalmente tiene un aspecto maculopapular o urticarial, pero el aspecto puede ser variable; hasta 30% de las reacciones de 15 hipersensibilidad han aparecido sin sarpullido. Las anomalías de laboratorio incluyen ensayos de la función hepática de resultados elevados, mayor creatina fosfoquinasa o creatinina, y linfopenia. Véase el inserto en el envase de Ziagen (sulfato de abacavir), Glaxo Wellcome, Research Triangle Park, NC (1998); Clay *et al.*, Management Protocol for Abacavir-related Hypersensitivity Reaction, Ann. Pharmacotherapy, 34(2):247 (2000). Clay *et al.* indican que solo la presencia de sarpullido no justifica el abandono del abacavir, a menos que aparezcan otros síntomas sistémicos 20 de una reacción de hipersensibilidad.

TNFalfa

Se sabe que la molécula efectora inmunológica factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) es polimórfica, y se ha indicado una serie de polimorfismos en la región del promotor de TNF α . Algunos informes indican que dichos 25 polimorfismos de promotor influyen en la enfermedad inmunológica (Bouma *et al.*, Scand. J. Immunol., 43:456 (1996); Allen *et al.*, Mol. Immunology, 36:1017 (1999)), mientras que otros sugieren que las asociaciones observadas entre polimorfismos de TNF α y aparición de la enfermedad no son debidas a los efectos funcionales del TNF α , sino al desequilibrio de ligamiento del TNF α con alelos de HLA seleccionables (Uglieri *et al.*, Tissue Antigens, 52:359 (1998)). Una lista de polimorfismos de promotor de TNF α es proporcionada por Allen *et al.*, Mol. Immunology, 36:1017 (1999). La numeración de los polimorfismos de TNF α varía entre autoridades, debido a la variación en las 30 secuencias indicadas para la región del promotor de TNF α ; en la presente, la numeración se refiere a la siguiente secuencia consenso proporcionada en Allen *et al.* (1999):

```

GGGAAGCAA AGGAGAAGCT GAGAAGATGA AGGAAAAGTC AGGGTCTGGA GGGGCGGGG -1000
TCAGGGAGCT CCTGGGAGAT ATGGCCACAT GTAGCGGCTC TGAGGAATGG GTTACAGGAG -940
ACCTCTGGGG AGATGTGACC ACAGCAATGG GTAGGAGAAT GTCCAGGGCT ATGGAAGTCG -880
AGTAT-GGGG ACCCCCCCTT AACGAAGACA GGGCCATGTA GAGGGCCCCA GGGAGTGAAA -820
GAGCCTCCAG GACCTCCAGG TATGGAATAC AGGGGACGTT TAAGAAGATA TGGCCACACA -760
CTGGGGCCCT GAGAAGTGAG AGCTTCATGA AAAAAATCAG GGACCCGAGA GTTCCTTGGA -700
AGCCAAGACT GAAACCAGCA TTATGAGTCT CCGGGTCAGA ATGAAAGAAG AGGGCCTGCC -640
CCAGTGGGGT CTGTGAATTC CCGGGGTGA TTTCCTCCC CGGGGCTGTC CCAGGCTTGT -580
CCCTGCTACC CCCACCCAGC CTTTCCTGAG GCCTCAAGCC TGCCACCAAG CCCCAGCTC -520
CTTCTCCCCG CAGGGACCCA AACACAGGCC TCAGGACTCA ACACAGCTTT TCCCTCCAAC -460
CCCGTTTCT CTCCCTCAA- GGACTCAGCT TTCTGAAGCC CCTCCAGTT CTAGTTCTAT -400
CTTTTTCCTG CATCCTGTCT GGAAGTTAGA AGGAAACAGA CCACAGACCT GGTCCCCAAA -340
AGAAATGGAG GCAATAGGTT TTGAGGGGCA TGCGGACGGG GTTCAGCCTC CAGGGTCTTA -280
CACACAAATC AGTCAGTGGC CCAGAAGACC CCCCTCGGAA TCGGAGCAGG GAGGATGGGG -220
AGTGTGAGGG GTATCCTTGA TGCTTGTGTG TCCCCAACTT TCCAAATCCC CGCCCCGCG -160
ATGGAGAAGA AACCGAGACA GAAGGTGCAG GGCCCACTAC CGCTTCTCCTC AGATGAGCTC -100
ATGGGTTTCT CCACCAAGGA AGTTTTCCGC TGTTGAATG ATTCTTTCCC CGCCCTCCTC -40
TCGCCCCAGG GACATATAAA GGCAGTTGTT GGCACACCCA GCCAGCAGAC GCTCCCTCAG +21
CAAGGACAGC AGAGGACCAG CTAAGAGGGA GAGAAGCAAC TGCAGACCCC CCC-TGAAAA +81
CAACCCTCAG ACGCCACATC CCCTGACAAG CTGCCAGGCA GGTTCT (SEQ ID NO:1)

```

El sitio de inicio de la transcripción (+1) se indica mediante negrita y subrayado; los polimorfismos G(-237)A y G(-308)A se indican con negrita y subrayado doble. Debido a la variación en las secuencias y la numeración indicadas, el polimorfismo G(-237)A también se ha denominado G-238A, y el polimorfismo G(-308)A está localizado en la posición -307 de la anterior secuencia. Otro polimorfismo, C(-5,100)G, investigado en la presente investigación, es un polimorfismo de C/G en la región no traducida 5' del TNF α :

```

TTCATTCCTC ATCAAATCTA AGCATAAAAA TAGTTTTCCTT CTGGGTCCTT GGGTCTTCAT
TTCTGAAGGC TCCCATGTCA CCTAAAACCTT TGATTAAATA AATGTATTAT GCTTTTCTCT
TGTTAATCTG TCTTTTATTA TAGGAGTATT GGCCATAACC CTTATGATGG GTCAGGAAGG
GATCACCCCT TTCTGCCCTT ACAGAAATAA TAGCTAAGAC TAGTAAAGCA TAAAAGGCAA
AGGGGCAGGT CCTCAAGTAG AGAAGAACAG GAGAAATAGC TCATACACAC CCAGAATGTT
ACTTACATGT CCCTCCATGT TACACCAAGA CCCCTCAGGG ACCTTGTGCC TGGGGAGAGA
AGTGGTCTGC CCCATGCAAC AGTGGGCTTT ACCCCGGGTC ACCACCAGCC CCAGCTCCAA
CCCCTCTAAC ACTCTCCAAG TAAAATCACA TNAGTAGCAG TAATAATATT TGAGGTGACA
AGTTGGTATT ATCTCAAACCT TAGGAAAAGT GAATAAAGTC ATCTTTAGAA ACTGCTTTTTT
TTAAACCCTT GTAACCCTGC AAGCTAAGTG AAAATGGGCT CATGTATGAG AATGTTTCGTG
TTAGACATTT TTTGGGTTTCG ACAAACCTAC GAAACAAACC AATCCCCATC ACAGATTTAT
TAGAATATAT TGATACAATA GAATATTACA TCATATTTTTT TTTAAAAACA TTACTGGTAC

```

(SEQ ID NO:13)

N = C/G

Allen *et al.* (*supra*) advierten que el número de polimorfismos de promotor de TNF α observados hasta la fecha son polimorfismos de G/A agrupados en la región de -375 a -162 pp; que algunos de estos polimorfismos se encuentran dentro de un motivo común; y sugieren que el motivo puede ser un sitio de unión consenso para un regulador transcripcional o que puede influir en la estructura del ADN. Se ha indicado que el polimorfismo de G/A en -237 afecta a la curvatura del ADN (D'Alfonso *et al.*, Immunogenetics, 39:150 (1994)). Huizinga *et al.* (J. Neuroimmunology, 72:149, 1997) indican una producción de TNF α significativamente menor en células estimuladas con LPS en individuos heterocigóticos (G/A) en -237 (comparado con individuos G/G); sin embargo, otro estudio no observó estos efectos (Pociot *et al.*, Scand. J. Immunol., 42:501, 1995). También se ha indicado que el polimorfismo G(-237)A afecta a enfermedades autoinmunitarias (Brinkman *et al.*, Br. J. Rheumatol., 36:516, 1997 (artritis reumatoide); Huizinga *et al.*, J. Neuroimmunology, 72:149, 1997 (esclerosis múltiple); Vinasco *et al.*, Tissue Antigens, 49:74, 1997 (artritis reumatoide)) y enfermedades infecciosas (Hohler *et al.*, Clin. Exp. Immunol., 111:579, 1998 (hepatitis B); Hohler *et al.*, J. Med. Virol., 54:173, 1998 (hepatitis C)).

Se sabe que las secuencias genéticas, de nucleótidos y de aminoácidos obtenidas de diferentes fuentes para el mismo gen pueden variar tanto en el esquema de numeración como en la secuencia precisa. Estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad de secuencia inherente dentro del gen y/o a errores de secuenciación. Por consiguiente, los expertos en la técnica entenderán que la referencia en la presente a un sitio polimórfico concreto con un número (por ejemplo, TNF α G-238A) incluye los sitios polimórficos que se corresponden en secuencia y localización dentro del gen, incluso si se emplean diferentes esquemas de numeración/nomenclatura para describirlos.

HLA

El complejo HLA de seres humanos (complejo de histocompatibilidad mayor o MHC) es una agrupación de genes relacionados localizada sobre el cromosoma 6 (los loci de TNF α y HLA B están muy cerca sobre el cromosoma 6). El complejo de HLA se clasifica en tres regiones: regiones de clase I, II, y III (Klein J., en: Gotze D, ed., The Major Histocompatibility System in Man and Animals, Nueva York, Springer-Verlag, 1976:339-378). Los HLA de clase I comprenden la proteína transmembrana (cadena pesada) y una molécula de microglobulina beta-2. Las proteínas transmembrana de clase I son codificadas por los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C. La función de las moléculas de HLA de clase I es presentar péptidos antigénicos (incluyendo antígenos de proteínas víricas) a células T. Se reconocen tres isoformas de moléculas MHC de clase II, denominadas HLA-DR, -DQ, y -DP. Las moléculas de MHC de clase II son heterodímeros compuestos por una cadena alfa y una cadena beta; diferentes cadenas alfa y beta son codificadas por subconjuntos de genes A y genes B, respectivamente. Se han reconocido diversos haplotipos de HLA-DR, y se diferencian en la organización y el número de genes DRB presentes sobre cada haplotipo DR; se han descrito múltiples genes DRB (Bodmer *et al.*, Eur. J. Immunogenetics, 24:105 (1997); Andersson, Frontiers in Bioscience, 3:739 (1998)).

El MHC muestra un alto polimorfismo; se han indicado más de 200 alelos genotípicos de HLA-B. Véase, por ejemplo, Schreuder *et al.*, *Human Immunology*, 60:1157-1181 (1999); Bodmer *et al.*, *European Journal of Immunogenetics*, 26:81-116 (1999). A pesar del número de alelos en los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C, el número de haplotipos observado en poblaciones es menor que lo que se esperaría de modo matemático. Ciertos alelos tienden a aparecer juntos sobre el mismo haplotipo, en lugar de segregarse aleatoriamente. Esto se denomina desequilibrio de ligamiento ("linkage disequilibrium", LD) y puede ser cuantificado por métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Devlin y Risch, *Genomics*, 29:311 (1995); BS Weir, *Genetic Data Analysis II*, Sinauer Associates, Sunderland, MD (1996)).

Los productos codificados por los loci de HLA polimórficos habitualmente se tipifican por métodos serológicos para el ensayo de histocompatibilidad de trasplantes y transfusiones, y la terapia con componentes sanguíneos. La tipificación serológica se basa en reacciones entre sueros caracterizados y productos génicos de HLA. Las técnicas conocidas para el ensayo de la histocompatibilidad incluyen microlinfocitotoxicidad y citometría de flujo. La microlinfocitotoxicidad habitual para la tipificación de antígenos de HLA determina el perfil de antígenos HLA de los linfocitos de un sujeto, utilizando un panel de antisueros HLA bien caracterizados. El alelo HLA-B57 está bien caracterizado, y son conocidos los métodos serológicos para detectar HLA-B57. Véase, por ejemplo, ASHI Laboratory Manual, 4ª edición, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (2000); Hurley *et al.*, *Tissue Antigens*, 50:401 (1997).

Más recientemente, se han desarrollado métodos para el análisis de polimorfismos de HLA a nivel genético. Los métodos de tipificación de HLA no serológicos incluyen el uso del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de ADN (RFLP; véase, por ejemplo, Erlich, patente de EEUU n.º 4.582.788 (1986)), u oligonucleótidos marcados, para identificar secuencias de ADN de HLA específicas. Estos métodos pueden detectar polimorfismos localizados en la secuencia codificadora o no codificadora del genoma. Véase, por ejemplo, Bidwell *et al.*, *Immunology Today*, 9:18 (1988); Angelini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4489 (1986); Scharf *et al.*, *Science*, 233:1076 (1986); Cox *et al.*, *Am. J. Hum. Gen.*, 43:954 (1988); Tiercy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:198 (1988); y Tiercy *et al.*, *Hum. Immunol.*, 24:1 (1989). El proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase patente de EEUU n.º 4.683.202, 1987) permite la amplificación de ADN genómico y ahora se utiliza para procedimientos de tipificación de HLA. Véase, Saiki *et al.*, *Nature*, 324:163 (1986); Bugawan *et al.*, *J. Immunol.*, 141:4024 (1988); Gyllensten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7652 (1988). Véase también, por ejemplo, Ennis *et al.*, *PNAS USA*, 87:2833 (1990); Petersdorf *et al.*, *Tissue Antigens*, 46:77 (1995); Girdlestone *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 18:6702 (1990); Marcos *et al.*, *Tissue Antigens*, 50:665 (1997); Steiner *et al.*, *Tissue Antigens*, 57:481 (2001); Madrigal *et al.*, *J. Immunology*, 149:3411 (1992).

Tal como se emplea en la presente, "genotipificar" un locus HLA se refiere a métodos que identifican la presencia o la ausencia de un alelo concreto, o de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos; las variaciones de secuencia pueden detectarse de modo directo (mediante secuenciación) o indirecto (por ejemplo, mediante análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos, o detección de la hibridación de una sonda de secuencia conocida, o polimorfismo de conformación de hebra de referencia). Los alelos de HLA puede detectarse de modo serológico, tal como se conoce en la técnica.

Se han asociado alelos de HLA diferenciados con un mayor o menor riesgo de avance de la enfermedad del VIH. Se han asociado los alelos HLA-B57 y HLA-B14 con la infección por VIH no progresiva, mientras que se han asociado HLA-A29 y HLA-B22 con la progresión rápida (Goulder *et al.*, *J. Virology*, 74:5291 (2000); Hendel *et al.*, *J. Immunology*, 162:6942 (1999)). Carrington *et al.* han indicado que la frecuencia del alelo HLA-B57 en cohortes de pacientes infectados por VIH es 4,40% en caucásicos y 5,7% en afroamericanos (Carrington *et al.*, *Science*, 283:1748 (1999)).

MICA y MICB

El gen A relacionado con la cadena de MHC de clase I (HLA) (MICA) y el gen B relacionado con la cadena de MHC de clase I (HLA) (MICB) pertenecen a una familia de genes de múltiples copias localizados en la región del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I cerca del gen HLA-B. Están localizados dentro de una región de enlace sobre el cromosoma 6p alrededor de HLA-B y TNFalfa. Las moléculas de MHC de clase I codificadas son inducidas por factores de estrés, tales como infección y choque térmico, y son expresadas sobre el epitelio gastrointestinal.

Se ha indicado que MICA es altamente polimórfico. La aparición de polimorfismos de un único nucleótido de MICA en diversos grupos étnicos ha sido indicada por Powell *et al.*, *Mutation Research*, 432:47 (2001). Se ha indicado que los polimorfismos en MICA están asociados con diversas enfermedades, aunque en algunos casos la asociación ha sido atribuida a un desequilibrio de ligamiento con los genes HLA. Véase, por ejemplo, Salvarani *et al.*, *J. Rheumatol.*, 28:1867 (2001); Gonzalez *et al.*, *Hum. Immunol.*, 62:632 (2001); Seki *et al.*, *Tissue Antigens*, 58:71 (2001).

Se han indicado diversas formas polimórficas de MICB (véase, por ejemplo, Visser *et al.*, *Tissue Antigens*, 51:649 (1998); Kimura *et al.*, *Hum. Immunol.*, 59:500 (1998); Ando *et al.*, *Immunogenetics*, 46:499 (1997); Fischer *et al.*, *Eur. J. Immunogenet.*, 26:399 (1999)).

A continuación, se proporciona una secuencia parcial para el gen MICA de *Homo sapiens*, que incluye los exones 2 y 3 (GenBank, referencia AJ295250).

exón 2 <1..255
exón 3 530..817

```

1 agccccacag tcttcgttat aacctcacgg tgctgtccgg ggatggatct gtgcagtcag
61 ggtttctcgc tgagggacat ctggatggtc agcccttctt gcgctgtgac aggcagaaat
121 gcagggcaaa gccccaggga cagtgggcag aagatgtcct gggaaataag acatgggaca
181 gagagaccag ggacttgaca gggaacggaa aggacctcag gatgaccctg gctcatatca
241 aggaccagaa agaaggtgag agtcggcagg ggcaagagtg actggagagg cttttccag
301 aaaagttagg ggcagagagc agggacctgt atctaccac tggatctggc tcaggctggg
361 ggtgaggaat gggggtcagt ggaactcagc agggaggtga gccggcactc agccccacaca
421 gggaggcatg gaggagggcc agggagggct acccctggg ctgagttcct cacttggggtg
481 gaaaggtgat gggttcggga atggagaagt cactgctggg tgggggcagg cttgcattcc
541 ctccaggaga ttagggtctg tgagatccat gaagacaaca gcaccaggag ctcccagcat
601 ttctactacg atggggagct cttcctctcc caaacctgg agactgagga atggacaatg
661 cccagtcct ccagagctca gacctggcc atgaacgtca ggaatttctt gaaggaagat
721 gccatgaaga ccaagacaca ctatcacgct atgcatgcag actgcctgca ggaactacgg
781 cgatatctaa aatccggcgt agtcctgagg agaacag (SEQ ID NO:2)

```

- 5 En el presente estudio se han investigado diversos polimorfismos de MICA. Los polimorfismos de MICA en el exón 2 (T/G; rs1063630 en la base de datos de the National Center for Biotechnology Information SNP (dbSNP)) y el exón 3 (A/G; rs1051792) se muestran arriba en negrita y subrayado doble. Otro polimorfismo de MICA investigado en el presente estudio (rs1052416) se localiza aproximadamente -9,263 bases 5' al sitio de inicio de la transcripción:

MICA (-9,263)

CACTGGGTTTGTTCAGTAAGCCACNTCGAATGTTGCTGTAGAATTAAGT
N=A/G
(SEQ ID NO:3)

- 10 Un cds completo para el gen MICB humano se proporciona en SEQ ID NO:4 (GenBank, registro U65416). Los polimorfismos de MICB investigados en el presente estudio incluyen uno en el exón 2 (rs1065075) y otro en el exón 3 (rs1051788):

MICB - (rs1065075) N = A/G

GTGGGCAGAAGATGTCCTGGGAGCTNAGACCTGGGACACAGAGACCGAGGA, SEQ ID NO:5

- 15 MICB (rs1051788) N = A/G

CAGGGGCTCCCGCATTTCTACTACNATGGGGAGCTCTTCCTCTCCCAAAA, SEQ ID NO:6

ARN helicasa p47 dependiente de ATP

- 20 La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de ARN helicasas dependientes de ATP, y también se denomina transcripción 1 asociada a HLA-B 1 (BAT1) (véase, por ejemplo GenBank, n.º de registro AF029061). Se ha localizado un agrupamiento de genes conocido como BAT1-BAT5 cerca de TNF y de los genes TNF. De han identificado diversos polimorfismos en la ARN helicasa p47 dependiente de ATP, que incluyen:

N = A/T

TTTGTTTCTCCTTAAGTGGCATTGACTGTCCATTGCAGCATTCTGATCNTA
AAAGACATCCACTTTGCTAATGCACACGAGATTCTCTTAGTTGAAGTA
SEQ ID NO:7

RS929138; N = C/T CTTTGGCAATTCTATATGGTGAGCTNTAAAGGTGGGCTCCAGGTAGGGATG, SEQ ID NO:8

- 25 Definiciones

- 30 Se sabe que las secuencias genéticas, de nucleótidos y de aminoácidos obtenidas de diferentes fuentes para el mismo gen pueden variar tanto en el esquema de numeración como en la secuencia precisa. Estas diferencias pueden ser debidas a los esquemas de numeración, a la variabilidad de secuencia inherente dentro del gen y/o a errores de secuenciación. Por consiguiente, los expertos en la técnica entenderán que la referencia en la presente a un sitio polimórfico concreto con un número (por ejemplo, TNFα G-238A) incluye los sitios polimórficos que se

corresponden en secuencia y localización dentro del gen, incluso si se emplean diferentes esquemas de numeración/nomenclatura para describirlos.

5 Tal como se emplea en la presente, una "reacción de hipersensibilidad" (HSR) a un fármaco se refiere al desarrollo de una respuesta de tipo inmunológica a una molécula de un fármaco o a un metabolito del fármaco. Esta respuesta generalmente se caracteriza por múltiples síntomas y es coherente con las descripciones clínicas de estos síndromes (Knowles *et al.*, Lancet, 356:1587 (2000); Carr *et al.*, Lancet, 356:1423, (2000)). La reacción inmunológica comparte características, pero no es necesariamente idéntica, con los tipos presentes en el sistema de Gell y Coombs. Véase, Sullivan, T.J., Drug allergy, en Middleton *et al.* (eds.), Allergy: Principles and Practice, 4^a ed., St. Louis, Mosby, 1993, p. 1730. Las HSR al abacavir pueden caracterizarse por la aparición de múltiples síntomas o de síntomas individuales, y puede establecerse el diagnóstico clínico de HSR al abacavir o HSR probable al abacavir basándose en la presencia de una o más señales y síntomas clínicos, descubrimientos físicos, con o sin anomalías de laboratorio, como será evidente para los expertos en la técnica.

10 La administración de abacavir a un sujeto (o "tratar" un sujeto con abacavir) comprende métodos y vías de administración conocidos en la técnica. Los regímenes terapéuticos recomendados (cantidades de dosificación y programación, concentraciones plasmáticas) del abacavir son conocidos en la técnica. Tal como se emplea en la presente, la administración de abacavir no se limita al tratamiento de la enfermedad relacionada con VIH o SIDA, sino que incluye su uso médico para otros trastornos que pueden tratarse con abacavir.

15 Tal como se emplea en la presente, la administración de un inhibidor de la transcriptasa inversa farmacéutico a un sujeto comprende la administración de una cantidad eficaz del agente farmacéutico al sujeto que lo necesita. La dosis de un agente farmacéutico puede determinarse según métodos conocidos y aceptados en las técnicas farmacéuticas, y puede ser determinada por los expertos en la técnica. Los inhibidores de la transcriptasa inversa (NRTI y NNRTI) son conocidos para el tratamiento de la enfermedad del VIH y/o SIDA.

20 Tal como se emplea en la presente, el "alelo HLA-B57" se refiere a un alelo HLA-B que se caracteriza serológicamente como el alelo HLA-B57, tal como se conoce en la técnica. Se reconocerá que los alelos HLA-B57 serológicamente caracterizados comprenden variantes de secuencia que pueden ser detectados a nivel de la secuencia del ácido nucleico (por ejemplo, HLA-B*5701, HLA-B*5702; véase, por ejemplo, Schreuder *et al.*, Human Immunology, 60:1157-1181 (1999)).

25 Tal como se emplea en la presente, "genotipificar" un sujeto (o una muestra de ADN) para un alelo polimórfico de un gen o genes significa detectar qué forma o formas alélicas o polimórficas del gen o genes están presentes en un sujeto (o una muestra). Tal como se conoce en la técnica, un individuo puede ser heterocigótico u homocigótico para un alelo concreto. Pueden existir más de dos formas alélicas, por lo que pueden ser posibles más de tres genotipos. Para los objetivos de la presente invención, "genotipificación" incluye la determinación de los alelos de HLA utilizando técnicas serológicas adecuadas, según se conoce en la técnica. Tal como se emplea en la presente, un alelo puede ser "detectado" cuando otros posibles variantes alélicos se hayan descartado; por ejemplo, cuando se descubre que una posición especificada en un ácido nucleico no es adenina (A), timina (T) ni citosina (C), puede concluirse que está presente guanina (G) en esa posición (es decir, se "detecta" G).

30 Tal como se emplea en la presente, un "subconjunto genético" de una población consiste en los miembros de la población que tienen un genotipo concreto. En el caso de un polimorfismo bialélico, una población puede dividirse potencialmente en tres subconjuntos: homocigóticos para el alelo 1 (1,1), heterocigóticos (1,2), y homocigóticos para el alelo 2 (2,2). Una "población" de sujetos puede definirse utilizando diversos criterios, por ejemplo, los individuos que se están tratando con abacavir, los individuos infectados por VIH, los individuos con unos antecedentes étnicos concretos. Se sabe que la frecuencia de un alelo concreto puede diferir entre poblaciones de diferentes antecedentes étnicos. Por ejemplo, se ha indicado que la frecuencia alélica de HLA-B57 es aproximadamente 4% entre negros y caucásicos (por consiguiente, aproximadamente 8% de esta población porta al menos una copia del alelo HLA-B57), pero entre los japoneses, se ha indicado que la frecuencia es 0,3% (Cao *et al.*, Human Immunology, 62:1009 (2001)). La distribución de subtipos de HLA-B57 también varía con la etnicidad, siendo >90% de los caucásicos HLA-B57-positivos para el subtipo HLA-B5701, comparado con aproximadamente 60% de los afroamericanos (Williams *et al.*, Human Immunology, 62:645 (2001)).

35 Tal como se emplea en la presente, un sujeto que está "predispuesto" o "tiene un mayor riesgo" a una respuesta fenotípica concreta, basándose en la genotipificación, será más probable que muestre este fenotipo que un individuo con un genotipo diferente al del locus (o loci) polimórfico diana. Cuando la respuesta fenotípica se basa en un polimorfismo multialélico, o en la genotipificación de más de un gen, el riesgo relativo puede diferir entre los múltiples genotipos posibles.

40 Un "ensayo genético" (también denominado cribado genético), tal como se emplea en la presente, se refiere al ensayo de una muestra biológica procedente de un sujeto para determinar el genotipo del sujeto, y puede utilizarse para determinar si el genotipo del sujeto comprende alelos que provocan, o que aumentan la susceptibilidad a un fenotipo concreto (o que están en desequilibrio de ligamiento con un alelo o alelos que provocan o aumentan la susceptibilidad a este fenotipo).

El "desequilibrio de ligamiento" se refiere a la tendencia de alelos específicos en diferentes localizaciones genómicas a aparecer juntos con más frecuencia que la esperada por el azar. Los alelos en unos loci concretos están en equilibrio completo si la frecuencia de cualquier conjunto concreto de alelos (o haplotipo) es el producto de sus frecuencias en la población individuales. Una medición del desequilibrio de ligamiento que se emplea habitualmente es r:

$$r = \frac{\hat{\Delta}_{AB}}{\sqrt{(\tilde{\pi}_A + \hat{D}_A)(\tilde{\pi}_B + \hat{D}_B)}}$$

en la que

$$\tilde{\pi}_A = \tilde{p}_A(1-\tilde{p}_A), \tilde{\pi}_B = \tilde{p}_B(1-\tilde{p}_B), \hat{D}_A = \tilde{P}_{AA} - \tilde{p}_A^2, \hat{D}_B = \tilde{P}_{BB} - \tilde{p}_B^2$$

$$\hat{\Delta}_{AB} = \frac{1}{n}n_{AB} - 2\tilde{p}_A\tilde{p}_B$$

n^2 tiene una distribución chi-cuadrado aproximada con 1 grado de libertad para marcadores bialélicos. Se considera que los loci que muestran un r tal que n^2 es mayor que 3,84, que se corresponde con una estadística de chi-cuadrado significativa al nivel 0,05, están en desequilibrio de ligamiento (B.S. Weir, 1996, Genetic Data Analysis II Sinauer Associates, Sunderland, MD).

Como alternativa, una medición normalizada del desequilibrio de ligamiento puede definirse como:

$$D'_{AB} = \begin{cases} \frac{D_{AB}}{\min(p_A p_B, p_a p_b)}, & D_{AB} < 0 \\ \frac{D_{AB}}{\min(p_A p_b, p_a P_B)}, & D_{AB} > 0 \end{cases}$$

El valor de D' tiene un intervalo de -1,0 a 1,0. Cuando el valor D' absoluto estadísticamente significativo para dos marcadores no es menor que 0,3, se considera que están en desequilibrio de ligamiento.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "un genotipo HLA-B57" se refiere a un genotipo que incluye el alelo HLA-B57. Un genotipo HLA-B57 puede identificarse detectando la presencia de un alelo HLA-B57, o detectando un marcador genético conocido por estar en desequilibrio de ligamiento con HLA-B57.

Tal como se emplea en la presente, la determinación de un genotipo "multilocus" se refiere a la detección, dentro de un individuo, de los alelos presentes en más de un locus. Un sujeto puede ser genéticamente seleccionado para determinar la presencia o la ausencia de un alelo HLA (por ejemplo, el alelo HLA-B57) y un alelo TNF α (por ejemplo, en el locus TNF α G(-237)A).

Tal como se emplea en la presente, el proceso de detectar un alelo o un polimorfismo incluye, pero no se limita a métodos serológicos y genéticos. El alelo o el polimorfismo detectado puede estar funcionalmente implicado en afectar al fenotipo de un individuo, o puede ser un alelo o un polimorfismo que esté en desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo/alelo funcional. Los polimorfismos/alelos se manifiestan en el ADN genómico de un sujeto, pero también pueden detectarse en ARN, ADNc o secuencias de proteínas transcritas o traducidas a partir de esta región, tal como será evidente para los expertos en la técnica.

Los alelos, polimorfismos o marcadores genéticos que están "asociados" con HSR a un NRTI, tal como abacavir, están sobrerrepresentados en frecuencia en sujetos tratados que sufren HSR, comparado con sujetos tratados que no sufren HSR, o comparados con la población general.

Según los presentes métodos, los sujetos que se están tratando con abacavir, o que están considerando un tratamiento con abacavir, pueden seleccionarse como ayuda para predecir su riesgo de sufrir una reacción de hipersensibilidad al abacavir. El cribado comprende obtener una muestra biológica del sujeto y analizarla para determinar el genotipo de los genes TNF α y/o HLA, es decir, para determinar la presencia o la ausencia de polimorfismos en uno o ambos genes, que están asociados con un mayor riesgo de HSR al abacavir (comparado con el riesgo asociado con otros polimorfismos).

Los presentes inventores han establecido que existe una correlación entre el genotipo de HLA de un individuo (en particular, de clase I, y más en particular HLA-B) y/o el genotipo de TNF α , y el riesgo de sufrir una reacción de hipersensibilidad a la administración de abacavir. Por consiguiente, un método para evaluar el riesgo relativo de un individuo de HSR al abacavir implica genotipificar ese individuo en el gen TNF α o los genes HLA para determinar si

el genotipo del individuo lo expone a un mayor riesgo de HSR al abacavir. Los individuos que poseen un genotipo TNF α o HLA que previamente se han asociado a una mayor incidencia de HSR al abacavir (comparado con la incidencia de HSR en sujetos con otros genotipos) tienen mayor riesgo de HSR.

5 Los presentes métodos de cribado comprenden genotipificar un sujeto en los genes HLA, en particular los genes HLA de clase I, más en particular el gen HLA-B, que incluye detectar la presencia o la ausencia del alelo HLA-B57 (según se define en la presente).

10 Los presentes métodos de cribado comprenden también genotipificar un sujeto en el gen TNF α , y más en particular detectar el genotipo en el sitio polimórfico de TNF α G(-237)A (según se define en la presente), en los que la detección de un alelo A indica un mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad, comparado con la detección de un genotipo G/G.

15 A la vista de la presente descripción, será evidente para los expertos en la técnica cómo determinar otros genotipos de TNF α y/o HLA que están asociados con un mayor riesgo de HSR al abacavir. Se conocen diversas formas alélicas de los genes TNF α y HLA, y en la técnica se conocen métodos para tipificar los genes TNF α y HLA. A medida que se detecten otros polimorfismos en genes TNF α y HLA humanos, la tipificación de dichos polimorfismos puede basarse en métodos conocidos. Por consiguiente, se puede tipificar una población de sujetos que han recibido abacavir, y correlacionar el genotipo de TNF α y/o HLA con la aparición de HSR. En un método alternativo, se pueden genotipificar solo los sujetos que han sufrido HSR y, cuando se conozca la prevalencia de un alelo de TNF α o HLA en una población control concordante (no HSR), determinar si el alelo está sobrerrepresentado en la población HSR, lo cual indica que está asociado con HSR. Tal como será evidente para los expertos en la técnica, la
20 detección de un alelo TNF α o HLA puede realizarse mediante la tipificación de marcadores genéticos que se sepa que están en desequilibrio de ligamiento con el alelo/polimorfismo de TNF α o HLA diana. Preferiblemente, estos marcadores están en desequilibrio de ligamiento sustancial, más preferiblemente los marcadores están en desequilibrio de ligamiento completo.

25 La presente invención también proporciona un método para evaluar el riesgo relativo de un individuo a sufrir HSR al abacavir, determinando el genotipo de ambos genes TNF α y HLA, para determinar si el genotipo del individuo lo expone a un mayor riesgo de HSR al abacavir. Los individuos que poseen un genotipo TNF α /HLA combinado que esté asociado a una mayor incidencia de HSR al abacavir (comparado con la incidencia de HSR en sujetos con otros genotipos) tienen mayor riesgo de HSR. En particular, los presentes métodos pueden comprender detectar la forma alélica del polimorfismo de TNF α G(-237)A y la presencia o la ausencia del alelo HLA-B57 (y/o marcadores en desequilibrio de ligamiento con estos).
30

Puesto que existen múltiples genotipos de TNF α y HLA, será evidente para los expertos en la técnica que el riesgo relativo de HSR al abacavir puede variar entre los múltiples genotipos. Por ejemplo, en un método de cribado de multilocus en el que se encuentran más de dos genotipos, puede determinarse que el riesgo relativo sea mayor para un genotipo, menor para otro, e intermedio en otros. Puede considerarse un "mayor riesgo" cuando se compara con el riesgo en una población que no haya sido estratificada según el genotipo (una población general), o puede ser mayor cuando se compara con el riesgo esperado en otro genotipo definido.
35

Por tanto, la presencia de un genotipo predeterminado particular que esté asociado con un mayor riesgo de HSR indica una mayor probabilidad de que el individuo muestre el fenotipo asociado (reacción HSR) con relación a sujetos con otros genotipos. El genotipo raramente será absolutamente predictivo, es decir, cuando una población con un cierto genotipo muestra una alta incidencia de un fenotipo asociado, no todos los individuos con ese genotipo mostrarán el fenotipo. De forma similar, algunos individuos con un genotipo diferente pueden mostrar el mismo fenotipo. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que la genotipificación de un sujeto según se describe en la presente será una ayuda para predecir el riesgo de un sujeto a HSR frente a un tratamiento con abacavir, y así ayudará a tomar decisiones de tratamiento. Los presentes métodos pueden comprender también administrar abacavir a sujetos después de un cribado, en sujetos en los que se considera que el riesgo de HSR es aceptable; la decisión final del tratamiento se basará en otros factores además del ensayo genético (tal como será evidente para los expertos en la técnica), que incluyen el estado de salud global del sujeto y el resultado esperado del tratamiento.
40
45

50 Será evidente para los expertos en la técnica que los presentes métodos también pueden aplicarse cuando se producen reacciones de hipersensibilidad en respuesta a análogos de nucleósidos sintéticos que no sean abacavir, y en particular NRTI. En particular, estos compuestos incluyen análogos de nucleósidos de purina, análogos de nucleósidos de purina que contienen un anillo de carbono insaturado en lugar del 2'-desoxirribósido de los desoxinucleósidos naturales, y análogos de nucleósidos de purina que contienen un anillo de ciclopenteno insaturado en lugar del 2'-desoxirribósido de los desoxinucleósidos naturales. Además, los presentes métodos son aplicables cuando aparece HSR en respuesta a NNRTI, tales como efavirenz (SUSTIVA™, Dupont Pharmaceuticals) y nevirapina (VIRAMUNE®, Boehringer Ingelheim/Roxane).
55

Según los presentes métodos, un compuesto (tal como un NRTI o NNRTI) puede seleccionarse para la variación en la incidencia de HSR entre subpoblaciones genéticas de sujetos. Estos métodos incluyen administrar el compuesto a una población de sujetos, obtener muestras biológicas de los sujetos (que puede realizarse antes o después de la

administración del compuesto), genotipificar los sitios alélicos polimórficos en el gen TNF α y/o los genes HLA de clase I (en particular, el gen HLA-B), y correlacionar el genotipo de los sujetos con su respuesta fenotípica (por ejemplo, la ausencia de una reacción de hipersensibilidad frente a la presencia de una reacción de hipersensibilidad presunta o confirmada). Tal como será evidente para los expertos en la técnica, debido a la naturaleza grave de HSR, puede ser necesario detener la administración de un compuesto farmacéutico cuando se sospeche una reacción de hipersensibilidad debido a la presencia de sarpullidos y/u otros síntomas compatibles con el síndrome clínico. La correlación de ciertos genotipos con una mayor proporción de HSR (tanto si se ha confirmado como si se existe sospecha clínica de HSR), comparado con la incidencia de HSR en sujetos con otros genotipos, indica que la incidencia de HSR varía entre subpoblaciones genéticas.

Dicho de otro modo, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para determinar la correlación de un alelo polimórfico (tales como los que se encuentran en los alelos TNF α y/o HLA), con la incidencia de una reacción de hipersensibilidad a un compuesto farmacéutico, en particular un NRTI. Los sujetos se estratifican según el genotipo y se evalúa su respuesta al agente terapéutico (de forma prospectiva o retrospectiva) y se comparan los genotipos. De esta forma, pueden identificarse los genotipos que están asociados con una tasa mayor (o menor) de HSR. La mayor o menor tasa de HSR se compara con las tasas entre otros genotipos, o con una población como un todo (es decir, la incidencia en una población que no está estratificada según el genotipo).

Pueden detectarse alelos polimórficos determinando la secuencia polinucleotídica del ADN, o detectando la correspondiente secuencia en transcripciones de ARN a partir del gen polimórfico, o cuando el polimorfismo de ácido nucleico produzca un cambio en una proteína codificada, mediante la detección de dichos cambios en la secuencia de aminoácidos en las proteínas codificadas, utilizando cualquier técnica adecuada según se conoce en la técnica. Los polinucleótidos utilizados para la tipificación son generalmente de ADN genómico, o un fragmento de polinucleótido procedente de una secuencia polinucleotídica genómica, tal como en un banco preparado utilizando material genómico del individuo (por ejemplo, un banco de ADNc). El polimorfismo puede detectarse con un método que comprende poner en contacto una muestra de polinucleótido o de proteína procedente de un individuo, con un agente de unión específica para el polimorfismo, y determinar si el agente se une al polinucleótido o la proteína, indicando la unión que el polimorfismo está presente. El agente de unión también puede unirse a los nucleótidos y aminoácidos flanqueantes en uno o ambos lados del polimorfismo, por ejemplo, al menos 2, 5, 10, 15 o más nucleótidos o aminoácidos flanqueantes en total o en cada lado. En el caso en que la presencia del polimorfismo se esté determinando en un polinucleótido, este puede detectarse en la forma bicatenaria, pero generalmente se detecta en la forma monocatenaria.

El agente de unión puede ser un polinucleótido (mono- o bicatenario) generalmente con una longitud de al menos 10 nucleótidos, por ejemplo al menos 15, 20, 30, o más nucleótidos. Un agente polinucleotídico que se emplee en el método generalmente se unirá al polimorfismo de interés, y a la secuencia flanqueante, de una manera específica de secuencia (por ejemplo, se hibrida según el apareamiento de bases de Watson-Crick) y, así, generalmente tiene una secuencia que es total o parcialmente complementaria con la secuencia del polimorfismo y la región flanqueante. El agente de unión puede ser una molécula que sea estructuralmente similar a los polinucleótidos que comprenden unidades (tales como análogos de purina o pirimidina, ácidos nucleicos peptídicos, o derivados de ARN, tales como ácido nucleicos bloqueados (LNA)) capaces de participar en un apareamiento de bases de Watson-Crick. El agente puede ser una proteína, generalmente con una longitud de al menos 10 aminoácidos, tal como al menos 20, 30, 50, o 100 o más aminoácidos. El agente puede ser un anticuerpo (incluyendo un fragmento de dicho anticuerpo que es capaz de unirse al polimorfismo).

En una realización de los presentes métodos, se emplea un agente de unión como una sonda. La sonda puede estar marcada o ser capaz de ser marcada de modo indirecto. Puede utilizarse la detección del marcador para detectar la presencia de la sonda (unida) sobre el polinucleótido o la proteína del individuo. La unión de la sonda al polinucleótido o la proteína puede utilizarse para inmovilizar la sonda o el polinucleótido o la proteína (y así separarlo de una composición o disolución).

En otra realización de los presentes métodos, el polinucleótido o la proteína del individuo se inmoviliza sobre un soporte sólido y después se pone en contacto con la sonda. La presencia de la sonda inmovilizada sobre el soporte sólido (a través de su unión al polimorfismo) entonces se detecta, directamente detectando un marcador sobre la sonda, o indirectamente poniendo en contacto la sonda con un resto que se una a la sonda. En el caso de detectar un polimorfismo de polinucleótido, el soporte sólido en general está fabricado de nitrocelulosa o nailon. En el caso de un polimorfismo de proteína, el método puede basarse en un sistema ELISA.

Los presentes métodos pueden basarse en un ensayo de acoplamiento de oligonucleótidos, en el que se emplean dos sondas oligonucleotídicas. Estas sondas se unen a áreas adyacentes sobre el polinucleótido que contiene el polimorfismo, permitiendo (después de la unión) que las dos sonda se acoplen entre sí mediante una enzima ligasa apropiada. Sin embargo, las dos sondas sólo se unirán (de una manera que permita el acoplamiento) a un polinucleótido que contenga el polimorfismo, y por tanto, la detección del producto acoplado puede utilizarse para determinar la presencia del polimorfismo.

En una realización, la sonda se emplea en un sistema basado en el análisis de heterodúplex para detectar polimorfismos. En este sistema, cuando una sonda se une a una secuencia polinucleotídica que contiene el

polimorfismo, forma un heterodúplex en el sitio en el que aparece el polimorfismo (es decir, no forma una estructura bicatenaria). Esta estructura de heterodúplex puede detectarse utilizando una enzima que sea específica de una cadena sencilla o doble. Generalmente, la sonda es una sonda de ARN, y la enzima utilizada es una ARNasa H que rompe la región de heterodúplex, permitiendo así detectar el polimorfismo mediante la detección de los productos de la ruptura.

El método puede basarse en un análisis de desapareamiento de ruptura química fluorescente, que se describe, por ejemplo, en PCR Methods and Applications, 3:268-271 (1994), y en Proc. Natl. Acad. Sci., 85:4397-4441 (1998).

En una realización, el agente polinucleotídico es capaz de actuar como cebador para una reacción de PCR solo si se une a un polinucleótido que contenga el polimorfismo (es decir, un sistema de PCR específico de secuencia o de alelo). Así, solo se producirá un producto de la PCR si el polimorfismo está presente en el polinucleótido del individuo, y la presencia del polimorfismo se determina mediante la detección del producto de la PCR. Preferiblemente, la región del cebador que es complementaria con el polimorfismo está en la región 3' final del cebador o cerca de esta. En una realización de este sistema, el polinucleótido y el agente se unirán a la secuencia de tipo salvaje pero no actúan como cebador para una reacción de PCR.

El método puede ser un sistema basado en el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Esto puede utilizarse si la presencia del polimorfismo en el polinucleótido crea o destruye un sitio de restricción que es reconocido por una enzima de restricción. Así, el tratamiento de un polinucleótido que tiene este polimorfismo conducirá a diferentes productos producidos, comparado con la correspondiente secuencia de tipo salvaje. Así, la detección de la presencia de productos de digestión de restricción concretos puede utilizarse para determinar la presencia del polimorfismo.

La presencia del polimorfismo puede determinarse basándose en el cambio que la presencia del polimorfismo produce sobre la movilidad del polinucleótido o la proteína durante una electroforesis en gel. En el caso de un polinucleótido, puede utilizarse el análisis del polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP). Este mide la movilidad del polinucleótido monocatenario sobre un gel desnaturizante, comparado con el correspondiente polinucleótido de tipo salvaje, indicando la detección de una diferencia en la movilidad la presencia del polimorfismo. Una electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE) es un sistema similar, en el que el polinucleótido se somete a electroforesis a través de un gel con un gradiente desnaturizante, indicando una diferencia en la movilidad, comparado con el correspondiente polinucleótido de tipo salvaje, la presencia del polimorfismo.

La presencia del polimorfismo puede determinarse utilizando un tinte fluorescente y un ensayo de PCR basado en un agente de extinción, tal como el sistema de detección de PCR TAQMAN™. En otro método para detectar el polimorfismo, un polinucleótido que comprende la región polimórfica se secuencia a través de la región que contiene el polimorfismo para determinar la presencia del polimorfismo.

Serán evidentes diversas otras técnicas de detección, adecuadas para su uso en los presentes métodos, para los familiarizados con los métodos de detección, identificación y/o distinción de polimorfismo. Estas técnicas de detección incluyen, pero no se limitan a la secuenciación directa, el uso de "balizas moleculares" (sondas oligonucleotídicas que fluorescen tras la hibridación, útiles en la PCR de fluorescencia a tiempo real; véase, por ejemplo, Marras *et al.*, Genet. Anal., 14:151 (1999)); detección electroquímica (reducción u oxidación de azúcares o bases del ADN; véase la patente de EEUU n.º 5.871.918 de Thorp *et al.*); amplificación de círculo rodante (véase, por ejemplo, Gusev *et al.*, Am. J. Pathol., 159:63 (2001)); el método de detección no basado en PCR de Third Wave Technologies (Madison WI) INVADER® (véase, por ejemplo, Lieder, Advance for Laboratory Managers, 70 (2000)).

Por consiguiente, cualquier técnica de detección adecuada según se conoce en la técnica puede utilizarse en los presentes métodos.

Tal como se emplea en la presente, "determinar" el genotipo de un sujeto no requiere realizar una técnica de genotipificación cuando el sujeto ya ha sido genotipificado, y los resultados del ensayo genético previo están disponibles; por consiguiente, determinar el genotipo de un sujeto incluyen remitirse a análisis genéticos previamente completados.

También se describe un ensayo o kit de ensayo predictivo (cuidado del paciente). Este ensayo ayudará al uso terapéutico de compuestos farmacéuticos, que incluyen NRTI, tales como abacavir, basándose en asociaciones predeterminadas entre genotipo y respuesta fenotípica al compuesto terapéutico. Este ensayo puede tomar diferentes formatos, que incluyen:

(a) un ensayo que analiza el ADN o ARN para determinar la presencia de alelos y/o polimorfismos predeterminados. Un kit de ensayo apropiado puede incluir uno o más de los siguientes reactivos o instrumentos: una enzima capaz de actuar sobre un polinucleótido (generalmente una polimerasa o una enzima de restricción), tampones adecuados para los reactivos enzimáticos, cebadores de PCR que se unen a regiones que flanquean el polimorfismo, un control positivo o negativo (o ambos), y un aparato de electroforesis en gel. El producto puede utilizar una de las tecnologías de chip descritas en la técnica. El kit de ensayo incluirá instrucciones impresas o legibles mediante una máquina que ofrezcan la correlación entre la presencia de un

genotipo específico y la probabilidad de que un sujeto tratado con un compuesto farmacéutico específico sufra una reacción de hipersensibilidad;

5 (b) un ensayo que analice materiales procedentes del cuerpo de un sujeto, tales como proteínas o metabolitos, que indican la presencia de un polimorfismo o un alelo predeterminado. Un kit de ensayo apropiado puede comprender una molécula, un aptámero, un péptido o un anticuerpo (incluyendo un fragmento de anticuerpo) que se une específicamente con una región polimórfica predeterminada (o una región específica que flanquea el polimorfismo). El kit puede comprender también uno o más reactivos o instrumentos adicionales (según se conoce en la técnica). El kit de ensayo incluirá también instrucciones impresas o legibles mediante una máquina que ofrezcan la correlación entre la presencia de un polimorfismo o un genotipo específico y la probabilidad de que un sujeto tratado con un análogo de nucleósido sintético específico sufra una reacción de hipersensibilidad;

Los especímenes biológicos adecuados para el ensayo son aquellos que comprenden células y ADN e incluyen, pero no se limitan a sangre o componentes sanguíneos, manchas de sangre seca, orina, hisopos bucales y saliva. Las muestras adecuadas para el ensayo serológico de HLA son muy conocidas en la técnica.

Ejemplos

15 **Ejemplo 1**

Diseño del estudio

Se realizó un estudio retrospectivo de casos-contróles con sujetos infectados por VIH adultos (>18 años de edad) que participaron en un programa de desarrollo clínico de abacavir de Glaxo Wellcome. Los sujetos se clasificaron como sujetos "caso" o "control" basándose en lo siguiente. Los sujetos caso habían sufrido un episodio de hipersensibilidad presunto o confirmado al abacavir; los sujetos control habían recibido abacavir durante al menos seis semanas, pero no habían sufrido un episodio de HSR presunto o confirmado. Se eligió el periodo de tratamiento de seis semanas basándose en el conocimiento de que la mayoría de los acontecimientos de HSR se producen dentro de las primeras seis semanas de tratamiento. Se recogieron las narraciones de los casos en el momento, o cerca de este, de la reacción de hipersensibilidad presunta o confirmada. Los sujetos control se hicieron concordar para el estudio (si era posible) de la etnicidad, el género, el recuento de células CD4+ (si está disponible; cuatro intervalos de CD4+: <50, 50-200, 201-500, >500 células/mm³); y la edad (más o menos 5 años). Cuando fue posible, también se hizo concordar el régimen de tratamiento ("no expuesto a tratamiento" frente a sometido a tratamiento).

30 La recogida de los datos incluyó la demografía (edad, género, raza, clasificación CDC para la infección por VIH); historia de alergias a medicinas y alimentos, sarpullidos por fármacos, asma, eccema, fiebre del heno, etc.; terapia antirretrovírica (ART) y medicaciones concomitantes tomadas en el momento de HSR (o, para los controles, durante las primeras seis semanas de tratamiento con abacavir).

El estado de casos-contróles, la demografía y la historia de alergias se proporcionan en las **tablas 1, 2 y 3**.

Tabla 1- Estados de casos-contróles (N = 123)

Estado de casos-contróles	n.º de concordantes	n.º de sujetos
1 caso - 2 controles	16	48 (39%)
1 caso - 1 control	14	28 (23%)
1 caso - 3 controles	1	4 (3%)
1 caso - 0 controles	14	14 (11%)
0 casos - 1 control	15	15 (12%)
0 casos - 2 controles	7	14 (11%)

35

Tabla 2 – Demografía

	Casos (N = 45)	Controles (N = 78)
Edad, media (intervalo)	42 (29-63)	40 (30-62)
Edad (años)		
18-35	15 (34%)	27 (35%)
35-54	25 (57%)	49 (63%)

>54	4 (9%)	2 (3%)
Género		
Hombre	40 (89%)	70 (90%)
Mujer	5 (11%)	8 (10%)

Tabla 3 - Historia de alergias

	Casos (N = 45)	Controles (N = 78)
Cualquier alergia	33 (73%)	46 (59%)
Alergia a sulfa-fármacos	14 (31%)	14 (18%)
Cualquier alergia a NNRTI*	9 (20%)	4 (5%)
Historia de sarpullido por otros fármacos	13 (29%)	14 (18%)

Se estudiaron los polimorfismos en una serie de genes candidatos. Los polimorfismos estudiados en el gen TNF α incluyen G(-237)A. También se estudió la presencia o la ausencia del alelo HLA-B57.

Ejemplo 2

5 Cribado de TNF α

Puede determinarse la presencia del polimorfismo de TNF α G(-237A) utilizando un tinte fluorescente y un ensayo de PCR basado en un agente de extinción, tal como la forma de discriminación de alelos del ensayo de la 5' nucleasa (Lee y Bloch, Nucleic Acids Research, 21:3761 (1993)). Brevemente, este ensayo emplea dos sondas específicas de alelo marcadas de forma diferente con tintes "indicadores" fluorescentes en los extremos 5' y con el mismo agente de extinción en los extremos 3'. Normalmente, la fluorescencia de cada tinte indicador es extinguida por el agente de extinción cuando está presente en la misma molécula oligonucleotídica. Las sondas específicas de alelo se utilizan junto con dos cebadores, uno de los cuales se hibrida con el molde 5' de las sondas específicas de alelo, mientras que el otro se hibrida con el molde 3' de dichas sondas.

15 Se determinó la presencia de polimorfismos de TNF α G(-237)A mediante el método de discriminación alélica, utilizando el ensayo de la 5'-nucleasa. Se emplearon dos sondas específicas de alelo con un tinte fluorescente diferente en los extremos 5', pero con el mismo agente de extinción en los extremos 3':

TNF α G(-237)A - G : FAM-CCTGCTCCGATTC (MGB) (SEQ ID NO:9)

TNF α G(-237)A - A: VIC-CCCTGCTCTGATTC (MGB) (SEQ ID NO:10)

20 Ambas sondas tenían un grupo fosfato 3', de modo que la polimerasa termoestable AmpliTaq Gold™ polimerasa no les podía añadir nucleótidos. Las dos sondas específicas de alelo se diseñaron utilizando un programa informático especializado, tal como se conoce en la técnica, de modo que se hicieron concordar ciertas propiedades (temperatura de fusión, contenido en GC, posición de la base polimórfica, localización dentro del amplicón) en la medida de lo posible, permitiendo solo una hibridación completa al ADN molde cuando la base polimórfica específica de alelo está presente.

25 Las sondas específicas de alelo se utilizaron junto con dos cebadores, uno de los cuales se hibrida con el molde 5' de las dos sondas específicas de alelo, mientras que el otro se hibrida con el molde 3' de las dos sondas.

TNF α G(-237)A directo: ATCAGTCAGTGCCCGAAGAC (SEQ ID NO:11)

TNF α G(-237)A inverso: GGGACACACAAGCATCAAGGATA (SEQ ID NO:12)

30 Si está presente el alelo que corresponde a una de las sondas específicas, la sonda específica se hibrida perfectamente con la secuencia diana derivada del molde. La polimerasa termoestable, que extiende el cebador en la dirección 5' a 3' hacia la sonda específica de alelo, elimina los nucleótidos de la sonda específica, liberando el tinte fluorescente y el agente de extinción. Esto produce un aumento en la fluorescencia desde el tinte indicador, que ya no está cerca del agente de extinción.

35 Si la sonda específica de alelo se hibrida con el otro alelo, el apareamiento incorrecto en el sitio polimórfico inhibe la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa termoestable y, así, evita la liberación del tinte indicador fluorescente.

Al final de los ciclos térmicos de la PCR, se emplea el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™7700 para medir el aumento en la fluorescencia desde cada tinte específico directamente en recipientes de reacción de PCR. Entonces se analiza la información de las reacciones. Si un individuo es homocigótico para un alelo concreto, se libera la fluorescencia correspondiente solo al tinte de esta sonda específica, pero si el individuo es heterocigótico, entonces aumenta la fluorescencia de ambos tintes.

Los resultados del cribado del polimorfismo de TNF α G(-237) se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Genotipo	Casos (N = 44)	Controles (N = 76)	valor de p
1,1 (G/G)	22 (50%)	71 (93%)	<0,0001
1,2 (G/A)	20 (45%)	4 (5%)	<0,0001
2,2 (A/A)	2 (5%)	1 (1%)	0,1573

La distribución de TNF α G(-237)A según diversos grupos étnicos se muestra en la **tabla 5** (basándose en el Cribado genético de una población genética disponible en el mercado).

Tabla 5

	G/G (1,1) N	A/G (1,2) N	A/A (2,2) N	Frecuencia alélica para G	Frecuencia alélica para A
Caucásicos (N = 88)	83	4	1	96,6%	3,4%
Afroamericanos (N = 86)	73	13	0	92,44%	7,56%
Hispanos (N = 50)	45	5	0	95,0%	5,0%
Asiáticos (N = 30)	28	2	0	96,7%	3,3%
Nativos americanos del SO (N = 8)	5	3	0	81,24%	18,75%

En el anterior estudio, en la mayoría de los casos se observa la presencia de un alelo "A" (genotipo A/A o A/G), comparado con los controles. El genotipo G/G aparece con menos frecuencia en los casos, comparado con los controles.

Ejemplo 3

15 Cribado de HLA-B57

Se realizó la genotipificación del gen HLA-B en muestras de 120 sujetos (44 casos y 76 controles) en los laboratorios de investigación de the Anthony Nolan Bone Marrow Trust (Royal Free Hospital, Londres, Reino Unido). La tipificación se realizó principalmente utilizando el análisis de la conformación mediado por la cadena de referencia ("Reference Strand-mediated Conformation Analysis" (RSCA); véase, por ejemplo, Pel-Freeze® Clinical Systems, LLC), tal como se conoce en la técnica (Arguello *et al.*, *Reviews in Immunogenetics*, 1:209 (1999); Arguello *et al.*, *Tissue Antigens*, 52:57 (1998)). Se emplearon técnicas de secuenciación de ADN y de sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia (SSOP) (véase, por ejemplo, Yoshida *et al.*, *Hum. Immunol.*, 34:257 (1992); Smith *et al.*, *Hum. Immunol.*, 55:74 (1997)) cuando fue necesario, como técnicas de respaldo para determinar el genotipo de HLA.

25 De todos los casos, se descubrió que 25/44 (57%) tenían el alelo HLA-B57 (es decir, eran heterocigóticos u homocigóticos para el alelo HLA-B57), mientras que sólo 3/76 (4%) de los controles tenían el alelo HLA-B57 (cada uno era heterocigótico para el alelo HLA-B57).

Tabla 6 - Frecuencia alélica - HLA-B57

	Casos (N = 44)	Controles (N = 76)	valor de p
HLA-B57 presente	25 (57%)	3 (4%)	<0,0001

En los sujetos que tienen al menos un alelo HLA-B57 (casos (n = 25) y controles (n = 3)), se muestra el subtipo de HLA-B57 en la **tabla 7**. El alelo más común es B*5701 (24/25 o 96% de los casos portaban al menos una copia, así como 1/3 o 33,3% de los controles).

- 5 En el presente estudio, el genotipo HLA-B57 se encontró con más frecuencia en los casos que en los controles.

Tabla 7 - Genotipo HLA-B de los casos y controles que tenían al menos un alelo HLA-B57

Genotipo HLA-B	n.º de sujetos	Porcentaje
CONTROLES		
N = 3		
B*0801, B*5701	1	33,3%
B*4501, B*57031	1	33,3%
B*4801, B*57031	1	33,3%
CASOS		
N = 25		
B*0702, B*5701	4	16,0%
B*07021, B*5701	1	4,0%
B*1402, B*5701	1	4,0%
B*1801, B*5701	1	4,0%
B*35011, B*5701	1	4,0%
B*3503, B*5701	1	4,0%
B*3701, B*5701	1	4,0%
B*3801, B*5701	3	12,0%
B*4001, B*5701	1	4,0%
B*4102, B*5701	1	4,0%
B*4402, B*5701	1	4,0%
B*44021, B*5701	1	4,0%
B*4403, B*5701	1	4,0%
B*44031, B*5701	1	4,0%
B*44031, B*5704	1	4,0%
B*4901, B*5701	1	4,0%
B*5501, B*5701	1	4,0%
B*5701, B*5701	2	8,0%
B*5701, B*57031	1	4,0%

Ejemplo 4

Los datos se obtuvieron de sujetos además de los indicados en los anteriores ejemplos. Los otros sujetos del estudio de casos-control retrospectivo descrito en el ejemplo 1 se seleccionaron para la presencia del polimorfismo de TNF α G(-237)A y HLA-B57. Los datos acumulados (combinando los resultados proporcionados en los ejemplos previos y los datos adicionales) se indican en las **tablas 8 y 9**. El número total de sujetos fue 161; en cinco sujetos no había

datos disponibles para el estado de TNF α G(-237)A, y no había datos disponibles en tres sujetos para el estado de HLA B57.

Tabla 8 - TNF α G(-237)A

Genotipo	Casos (N = 57)	Controles (N = 99)	valor de p
1,1 (G/G)	32 (56%)	92 (93%)	
1,2 (G/A)	23 (40%)	6 (6%)	<0,0001*
2,2 (A/A)	2 (4%)	1 (1%)	

* El valor de P procedente del ensayo de chi-cuadrado de Mantel Haenszel indica una diferencia estadísticamente significativa entre la tasa del alelo A presente en los casos frente a los controles.

Tabla 9 - Frecuencia alélica - HLA-B57

	Casos (N = 59)	Controles (N = 99)	valor de p
HLA-B57 presente	30 (51%)	3 (3%)	<0,0001*
HLA-B5701 presente	28 (47%)	1 (1%)	<0,0001

* El valor de P procedente del ensayo de chi-cuadrado de Mantel Haenszel indica una diferencia estadísticamente significativa entre la tasa de HLA B57 presente en los casos frente a los controles.

- 5 Los sujetos que tienen al menos un alelo HLA-B57 (casos = 30, y controles = 3) se ensayaron para determinar la aparición del subtipo HLA B*5701. En los casos, 28/30 (93%) tenían al menos un alelo B*5701; en los controles, 1/3 (33%) tenían al menos un alelo B*5701.

En el presente estudio, el genotipo HLA-B57 se encontró con más frecuencia en los casos que en los controles.

Ejemplo 5

10 Diseño del estudio

Se analizaron datos adicionales procedentes del estudio de casos-control retrospectivo descrito en el ejemplo 1, que incluye información de otros sujetos e información relacionada con otros genes candidatos. Los ejemplos 5 y 6 son acumulados e incluyen los resultados proporcionados en los ejemplos anteriores, así como datos adicionales. Los sujetos de los ejemplos anteriores son parte de la población mayor indicada en los ejemplos 5 y 6.

- 15 Se realizó un estudio de investigación de casos-control concordantes, retrospectivo y multicéntrico para identificar variantes de genes candidatos asociados con la hipersensibilidad al abacavir. Los sujetos eran individuos adultos (\geq 18 años de edad) infectados por VIH que participaron en un programa de desarrollo clínico de abacavir de GlaxoWellcome (ahora GlaxoSmithKline (GSK)). Se obtuvo el consentimiento informado. Los sujetos se clasificaron como "caso" o "control". Se emplearon los siguientes criterios para identificar los casos:

- 20 1. Sujetos que sufrieron síntomas coherentes con la hipersensibilidad al abacavir (véase n.º 2 siguiente); estos síntomas volvieron a las 12 horas de la reexposición al abacavir; se detuvo permanentemente el tratamiento con abacavir.
- 25 2. Sujetos que sufrieron dos o más de los siguientes síntomas en un intervalo de 2 días: fiebre, sarpullido, síntomas gastrointestinales (que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal) y que detuvieron permanentemente el tratamiento con abacavir.
3. Sujetos que fueron diagnosticados por un médico que no pertenece a GSK que habían desarrollado "HSR", "reacción alérgica", o "anafilaxis" que se atribuyó al abacavir y que detuvieron permanentemente el tratamiento con abacavir.

- 30 Antes del cribado de un sujeto como "caso", el diagnóstico de la hipersensibilidad al abacavir fue evaluado por un médico de GSK para determinar la coherencia con la presentación clínica de la hipersensibilidad.

- 35 Controles concordantes: Sujetos adultos infectados por VIH (18 años de edad) que participaron en el programa de desarrollo clínico de abacavir de GSK y que toleraron el abacavir durante al menos 6 semanas sin señales de una reacción de hipersensibilidad. Los sujetos control se hicieron concordar con un sujeto caso concreto en base a cinco criterios cuando fue posible: edad (más o menos 5 años), género, etnicidad, recuento de células CD4+, y régimen de tratamiento. Cuando fue posible, se reclutaron dos controles concordantes para cada caso inscrito en el estudio.

Gestión y procesamiento de la muestra

- 5 Se recogieron muestras sanguíneas en tubos de recogida de sangre apropiados. La extracción del ADN fue realizada por DNA Sciences (Morrisville, NC), y el ADN extraído se envió a GSK para la genotipificación. Con la excepción de la genotipificación de HLA, los ensayos genéticos fueron realizados por GSK. La tipificación de HLA fue realizada por the Anthony Nolan Bone Marrow Trust, Londres, Reino Unido. Los loci de HLA (A, B, y DR) fueron genotipificados mediante el método del análisis conformacional de cadena inversa (RSCA), utilizando secuenciación de ADN e hibridación de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) como respaldo (véase el ejemplo 3). Se genotipificaron marcadores polimórficos distintos de los loci de HLA utilizado la forma de discriminación alélica del ensayo de la 5' nucleasa (Applied Biosystems, Foster City, CA; véase el ejemplo 2).
- 10 Las muestras se analizaron para la presencia o la ausencia de 114 alelos polimórficos.

Sujetos de estudio

- 15 Se inscribieron un total de 229 sujetos y proporcionaron el consentimiento informado. Se excluyeron 29 sujetos (las muestras produjeron un ADN inadecuado y/o el sujeto retrospectivamente no cumplía los criterios de inclusión). Doscientos sujetos (85 de 100 casos, y 115 de 129 controles) tenían datos evaluables de al menos uno de los 114 marcadores genéticos. Un total de 157 muestras de los sujetos fueron evaluables para TNF α -237, y un total de 197 muestras de los sujetos fueron evaluables para HLA-B.

La población de estudio tenía una mediana de edad de 39,8 (24-65) años, y eran predominantemente hombres (92%) y caucásicos (74%). Las características demográficas y de línea de base fueron similares entre los casos y los controles concordantes. Veintisiete sujetos (14%) eran negros, y 21 (11%) eran hispanos (tabla 10).

20

Tabla 10

Resumen de las características demográficas y de línea de base según el estado de casos-contrroles			
Característica	Casos N = 85	Controles N = 115	Total N = 200
Edad^a (años)			
N	85	115	200
Mediana (intervalo)	40,3 (29-63)	39,8 (24-65)	39,8 (24-65)
18-35 años, n(%)	24 (28)	32 (28)	56 (28)
36-54 años, n(%)	55 (65)	78 (68)	133 (67)
≥55 años, n(%)	6 (7)	5 (4)	11 (6)
Sexo			
N	85	115	200
Hombres, n(%)	79 (93)	105 (91)	184 (92)
Mujeres, n(%)	6 (7)	10 (9)	16 (8)
Etnicidad			
N	85	115	200
Blancos, n(%)	66 (78)	82 (71)	148 (74)
Negros, n(%)	9 (11)	18 (16)	27 (14)
Asiáticos, n(%)	0	0	0
Hispanoamericanos, n(%)	7 (8)	14 (12)	21 (11)
Otros, n(%)	3 (4)	1 (<1)	4 (2)
Clase CDC^a			
N	85	114	199

A, n(%)	31 (36)	43 (38)	74 (37)
B, n(%)	16 (19)	22 (19)	38 (19)
C, n(%)	36 (42)	45 (39)	81 (41)
Otros, n(%)	2 (2)	4 (4)	6 (3)
a En el momento de comenzar con el abacavir			

5 Cincuenta de los 85 casos (59%) concordaban con al menos un control, y 41% de los casos no tenían control concordante (tabla 11). Las razones por las que carecen de controles incluyen: incapacidad para identificar un control concordante, y datos insuficientes. Para los 50 casos y sus 80 controles concordantes, 81% de los controles concordaban con un caso por la edad más o menos 5 años, 99% por género, 90% por la etnicidad, 4% por los recuentos de células CD4 (principalmente debido a datos insuficientes), y 94% por el régimen de tratamiento (o participación en el programa de acceso expandido de abacavir).

Tabla 11

Resumen del estado de casos-contróles		
Estado de casos HSR-contróles	n.º de grupos concordantes	n.º de sujetos N = 200 n(%)
1 caso HSR - 2 contróles	28	84 (42,0)
1 caso HSR - 1 control	21	42 (21,0)
1 caso HSR - 3 contróles	1	4 (2,0)
1 caso HSR - 0 contróles	35	35 (17,5)
0 casos HSR - 1 control	17	17 (8,5)
0 casos HSR - 2 contróles	9	18 (9,0)

Ejemplo 6

Resultados

10 Análisis univariante de la asociación genética con la hipersensibilidad

Para cada polimorfismo, se calcularon las frecuencias alélicas entre los casos y los controles utilizando análisis univariantes. Los polimorfismos (distintos de los polimorfismos de HLA) con frecuencias significativamente diferentes entre los casos y los controles (valor de p de 0,05 o menor) se identifican en la tabla 12 (ensayo exacto de Fisher o análisis de regresión logística condicional de la diferencia entre las tasas). El polimorfismo de TNF G(-237)A estaba presente en 25 de 58 casos (43%), comparado con 7 de 99 (7%) de los controles.

15

Tabla 12

Gen (posición SNP)	Referencia (NCBI dbSNP o GenBank)	Variante ^b	Casos	Contróles	valor de p
TNFα (-237)	RS361525	A2 = A	25 (43%)	7 (7%)	<0,0001
TNFα (-308)	RS1800629	A2 = A	5 (8%)	28 (28%)	0,0024
TNFα (-5.100)		A2 = G	8 (13%)	30 (31%)	0,0127
MICA (-9,263)	RS1052416	A1 = A	48 (92%)	64 (70%)	0,0015
		A2 = G	19 (37%)	66 (72%)	<,0001
MICA (exón 2)	RS1063630	A1 = T	40 (83%)	68 (96%)	0,0391 ^c
		A2 = G	38 (67%)	47 (48%)	0,0297
MICA (exón 3)	RS1051792	A1 = G	46 (77%)	88 (90%)	0,0384
		A2 = A	49 (82%)	57 (58%)	0,0029
MICB (exón 2)	RS1065075	A1 = G	23 (38%)	56 (57%)	0,0334
		A2 = A	48 (100%)	67 (92%)	0,0423 ^c
MICB (exón 3)	RS1051788	A1 = A	23 (38%)	56 (58%)	0,0209
		A2 = G	48 (100%)	65 (93%)	0,0858 ^c
ARN helicasa p47 dependiente de		A2 = T	27 (45%)	63 (66%)	0,0130

Gen (posición SNP)	Referencia (NCBI dbSNP o GenBank)	Variante ^b	Casos	Controles	valor de p
ATP					
ARN helicasa p47 dependiente de ATP	RS929138	A1 = C A2 = T	39 (68%) 46 (81%)	37 (39%) 91 (96%)	0,0007 0,0040
Alcohol deshidrogenasa ADH7 (ADH7-C94T)	Nucleótido 403 en GenBank entrada M16286 (5'UTR)	A1 = C A2 = T	3 (5%) 45 (96%)	16 (17%) 59 (84%)	0,0431 0,0606 ^c
UDP-glucuronosiltransferasa (UGT1A6-A551C)	Nucleótido 765 en GenBank M84130	A1 = A	46 (77%)	59 (60%)	0,0377
a A menos que se indique lo contrario, el valor de p se basa en el ensayo exacto de Fisher.					
b A1 = alelo 1, A2 = alelo 2.					
c El valor de p se basa en una regresión logística condicional entre los casos y sus controles concordantes.					

El análisis univariante de la tipificación de HLA muestra seis loci con frecuencias significativamente diferentes en los casos y los controles ($p < 0,1$, ensayo exacto de Fisher, tabla 13). De estos, la diferencia en la frecuencia de HLA-B57 era la más significativa ($p < 0,0001$). HLA-B57 estaba presente en 39 de 84 (46%) casos, frente a 4 de 113 (4%) controles.

5

Tabla 13

Resumen de los alelos HLA mediante el estado de casos-controles para los valores de $p < 0,1$ ^a			
Alelo HLA	Casos N (%)	Controles N (%)	valor de p
HLA-A31	0	6 (6%)	0,0839
HLA-B08	4 (5%)	15 (13%)	0,0526
HLA-B57	39 (46%)	4 (4%)	<,0001
HLA-DRB01	6 (10%)	21 (21%)	0,0826
HLA-DRB03	2 (3%)	18 (18%)	0,0060
HLA-DRB07	23 (38%)	21 (21%)	0,0277
a Ensayo exacto de Fisher.			

Entre los polimorfismos que no son HLA, los dos polimorfismos con la mayor significancia estadística fueron TNF α (-237) y MICA (-9263). Los genes HLA-B, MICA y TNF α están colocalizados muy cercanos entre sí sobre el cromosoma 6, y los resultados de la genotipificación fueron coherentes con la alta asociación alélica entre HLA-B57 y el alelo de TNF α G(-237)A.

- 10 HLA-B57 y TNF α están colocalizados muy cercanos entre sí sobre el cromosoma 6, y muestran una alta asociación alélica (tabla 14). En todos los casos, menos dos, las reacciones de hipersensibilidad con el alelo TNF α -238A también eran positivos a HLA-B57; cinco casos de hipersensibilidad que eran positivos a HLA-B57 carecían del alelo TNF α -238A.

Tabla 14

Resumen de la asociación de HLA-B57 y TNF α -237			
HLA-B57	TNF α -237	Casos HSR N (%)	Controles N (%)
Sujetos sin HLA-B57 N		30	96
	Alelo A	2 (7)	5 (5)
	Sin alelo A	28 (93)	91 (95)
Sujetos con HLA-B57 presente N		28	3
	Alelo A	23 (82)	1 (33)
	Sin alelo A	5 (18)	2 (67)

Análisis multivariante de la asociación genética con la hipersensibilidad

5 Se realizaron análisis multivariantes exploratorios para investigar las contribuciones de diferentes marcadores genéticos. Se realizó una regresión logística condicional utilizando un subconjunto de casos que tienen al menos un control concordante (50 casos y 80 controles, véase la tabla 11). Se realizó un análisis secundario utilizando la regresión logística con el total de 85 casos y 115 controles, independiente de la concordancia. Estos análisis indican que HLA-B57 es el marcador más robusto de los marcadores estudiados para la hipersensibilidad.

10 Se empleó el reparto recursivo para investigar si las combinaciones de variables, incluyendo alelos marcadores, podrían estar actuando para modificar significativamente el riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir. HLA-B57 fue el predictor más significativo sobre si un sujeto era un caso o un control (valor de p ajustado a Bonferroni < 0,0001) (tabla 15). De los 159 sujetos con datos suficientes para la inclusión en el análisis de reparto recursivo, 33 (21%) tenían HLA-B57; de estos, 30 (91%) eran casos. Entre los 33 sujetos positivos a HLA-B57, 31 eran negativos a DRB03; dentro de este grupo de 31 sujetos, 30 (97%) eran casos (valor de p ajustado a Bonferroni = 0,001).

Tabla 15

Resumen de los datos de reparto recursivo por HLA		
	Casos HSR N = 84	Controles N = 113
Sujetos con ≥ 1 alelo HLA-B57 presente, N(%)	39 (46)	4 (4)
Sujetos sin alelo HLA-B57, N(%)	45 (54)	109 (96)

20 Se descubrió una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de HLA-B57 y una historia de hipersensibilidad al abacavir. También se descubrió una asociación entre la presencia del polimorfismo de TNF - 237A y la hipersensibilidad al abacavir, pero esta asociación pueden justificarse casi por completo por la presencia de HLA-B57. Un tercer polimorfismo en la misma región, MICA -9263G, también resultó significativo mediante el análisis univariante, pero no en el análisis multivariante.

Análisis de los subgrupos

25 A continuación se presentan unos análisis descriptivos de los subgrupos demográficos. La mayoría de los sujetos en este estudio eran hombres blancos. Tal como se muestra en la tabla 16, 53% de los casos de hombres blancos tenían al menos un alelo HLA-B57, comparado con 3% de los controles de hombres blancos. Dos de nueve casos (22%) de hipersensibilidad entre hombres negros eran positivos a HLA-B57, comparado con 1 de 16 controles de hombres negros (6%). Entre los hispanos y otros grupos étnicos identificados, ninguno de los 9 casos eran positivos a HLA-B57, comparado con 1 de 13 controles.

Tabla 16

Resumen de los datos de HLA-B57 por etnicidad: Hombres				
Hombres	Etnicidad			
	Blancos	Negros	Otros	Total
Casos HSR				
N	60	9	9	78
HLA-B57, n(%)	32 (53)	2 (22)	0	34 (44)
Controles				
N	74	16	13	103
n (%)	2 (3)	1 (6)	1 (8)	4 (4)

La mayoría de los sujetos del estudio eran hombres. De los seis casos de mujeres inscritos, cinco eran blancas (tabla 17). Cuatro de los cinco casos de mujeres blancas eran positivos a HLA-B57, comparado con ninguno de los seis controles. Aunque la asociación no se ensayó estadísticamente, la tendencia se corresponde con la de los hombres blancos.

5

Tabla 17

Resumen de los datos de HLA-B57 por etnicidad: Mujeres				
Mujer	Etnicidad			
	Blancas	Negras	Otros	Total
Casos HSR				
N	5	0	1	6
HLA-B57, n(%)	4 (80)	0	1 (100)	5 (83)
Controles				
N	6	2	2	10
n (%)	0	0	0	0

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Glaxo Group Limited Seth Hetherington Arlene R. Hughes Eric Lai Michael Mosteller, Jr. Denise Shortino

<120> MÉTODO DE SELECCIÓN PARA LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD A UN FÁRMACO

<130> PU4539WO

5 <150> 60/314.026
<151> 21-08-2001

<150> 60/336.850
<151> 30-10-2001

<160> 13

10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 1183
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

```

ggggaagcaa aggagaagct gagaagatga aggaaaagtc agggctctgga ggggcggggg 60
tcagggagct cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg gttacaggag 120
acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccagggct atggaagtcg 180
agtatgggga cccccctta acgaagacag ggccatgtag agggcccag ggagtgaaag 240
agcctccagg acctccaggt atggaataca ggggacgttt aagaagatat ggccacacac 300
tggggccctg agaagtgaga gcttcatgaa aaaaatcagg gaccccagag ttccttgaa 360
gccaagactg aaaccagcat tatgagtctc cgggtcagaa tgaaagaaga gggcctgcc 420
cagtggggtc tgtgaattcc cgggggtgat ttcactcccc ggggctgtcc caggctgtc 480
cctgctacct ccaccagcc tttcctgagg cctcaagcct gccaccaagc cccagctcc 540
ttctccccgc agggacccaa acacaggcct caggactcaa cacagctttt ccctccaacc 600
ccgttttctc tcctcaagg actcagcttt ctgaagcccc tcccagttct agttctatct 660
tttctctgca tcctgtctgg aagttagaag gaaacagacc acagacctgg tccccaaaag 720
aatggaggc aataggtttt gaggggcatg gggacgggt tcagcctcca gggctctaca 780
caciaatcag tcagtggccc agaagacccc cctcggaatc ggagcagga ggatggggag 840
tgtgaggggt atccttgatg cttgtgtgtc cccaacttc caaatccccg ccccgcgat 900
ggagaagaaa ccgagacaga aggtgcaggg cccactaccg cttcctccag atgagctcat 960
gggtttctcc accaaggaag ttttcgctg gttgaatgat tctttccccg ccctctctc 1020
gccccagggg catataaagg cagttgttg cacaccagc cagcagacgc tcctcagca 1080
aggacagcag aggaccagct aagagggaga gaagcaactg cagaccccc ctgaaaacaa 1140
ccctcagacg ccacatcccc tgacaagctg ccaggcaggt tct 1183
    
```

<210> 2
<211> 817
<212> ADN
20 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

agccccacag tcttctgtat aacctcacgg tgctgtccgg ggatggatct gtgcagtcag 60
ggtttctcgc tgagggacat ctggatggc agcccttctc gcgctgtgac aggcagaaat 120
    
```

ES 2 425 115 T3

```

gcagggcaaa  gccccagggg  cagtgggcag  aagatgtcct  gggaaataag  acatgggaca  180
gagagaccag  ggacttgaca  gggaacggaa  aggacctcag  gatgaccctg  gctcatatca  240
aggaccagaa  agaaggtgag  agtcggcagg  ggcaagagtg  actggagagg  ccttttccag  300
aaaagttagg  ggagagagc  agggacctgt  atctaccac  tggatctggc  tcaggctggg  360
ggtgaggaat  gggggtcagt  ggaactcagc  agggaggtga  gccggcactc  agcccacaca  420
gggaggcatg  gaggagggcc  agggaggcgt  acccctggg  ctgagttcct  cacttgggtg  480
gaaaggtgat  gggttcggga  atggagaagt  cactgctggg  tgggggcagg  cttgcattcc  540
ctccaggaga  ttagggtctg  tgagatccat  gaagacaaca  gcaccaggag  ctcccagcat  600
ttctactacg  atggggagct  ctctctctcc  caaaacctgg  agactgagga  atggacaatg  660
ccccagtcct  ccagagctca  gaccttggcc  atgaacgtca  ggaatttctt  gaaggaagat  720
gccatgaaga  ccaagacaca  ctatcacgct  atgatgcag  actgcctgca  ggaactacgg  780
cgatatctaa  aatccggcgt  agtcctgagg  agaacag  .  817

```

<210> 3
 <211> 51
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

cactgggtt gttgcagtaa gccacytga atgttgctg agaattaaag t 51

<210> 4
 <211> 12930
 10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

gggccatggg  gctgggcccg  gtctgtctgt  ttctggccgt  cgccttccct  tttgcacccc  60
cggcagcccg  cgctgggtgag  tggggttcc  ggcggtcccc  ggcgagcggg  gaggcggggg  120
gcgtttccgg  gggtcgggtt  gggttgccgc  gagcgtctgt  cggcagggc  ggggctcagg  180
tgtgtctgtc  ggagtgcagg  gagctggacg  ccgctgttc  ccgccacacc  tcagccctgc  240
tttccatctc  cccgtctctt  ttttttttt  ttttttttt  ctttctgaga  cggagtctct  300
gtcgcctagg  ctgtagtgca  gtggcgcgat  attggctcac  tgcaagctcc  gcctcccggg  360
ttcacgccat  tctcctgcct  cagcctccct  agtagctggg  actacaggcg  cccgccacca  420
cgcccggcta  attttttgtg  tttttagtag  agatggggtt  tcaccgtgtt  agtcaggatg  480
gtctcgatct  cctgacctcg  tgatccgccc  gcctcggcct  cccaaagtgc  tgggattaca  540
ggcgtgagcc  accgcgccc  acctcccgtc  tccttcagt  cctcctcggg  atcgcgcact  600
accgcatttt  tctggtctcc  tctgcactt  gctctcctcg  cctctcctcc  gtctcctctc  660
acttttcgga  caaacagtc  ctctgaggc  cctgggttc  ccgggtgct  cctgtgaatg  720
gcattggaag  gccgttccag  cgcggccgct  gaggcagcca  cttccccggg  tgctgggggc  780
ggatctcagg  tocctgaagt  cctgtcctct  cccggagccg  atgtgttctc  agctcctggg  840
ccgcagctcc  tggagtggg  gccctcctt  ctgggaccc  ggaggtggg  cttcttgcta  900
ctgtgaggac  tgtgggggt  cctgactctc  aagctgagg  gttggagtct  gcaggctccg  960
ggcagaggat  tcttctgcg  acttctgtca  tcccagctc  attctcccct  cgcctccggc  1020
tccgggggtc  ctctcctctc  tcgatccca  cccctactaa  tgaccaatga  tctaaggaca  1080
ccagattccc  tctcaacctc  tccctgccc  tcttacggcg  ccctgggtcc  ttttgcctct  1140
ccagctccct  gctacccctt  cctgtgtgct  gttctctgat  ccatttctag  agtgcctct  1200
gccttcatcc  cccgcccccg  cactgaagg  tcctcctgc  ctctttatg  ggccttctc  1260
gcaagcagcc  ttcactcct  gctgcccta  tgctccca  ttcccaaatg  tccctgactc  1320
taactttctg  gtgctgcctt  ttgtccggg  ggttcttcc  tccatccac  tcccctccag  1380
accctaagg  agagccctga  tgctaattgg  agttgggct  taggcagggc  gcagggcagc  1440
gcagatgccc  cctcccctcc  agtcaggtg  cctgctctgg  gccctgcctc  attgtggccc  1500
cttcccact  ccttcatct  cagcctcacc  ctcttgagg  cccaccctc  cagcccacag  1560
gtgctggacc  atccctccct  ggtccctcc  cccctctcca  ccttgggacc  ttgtgctgct  1620
cctatctctt  gccagctgc  ctggggcct  cagcaagttc  tcatctttca  gtgggaaagt  1680
gggagtgtg  gagcatatga  cagtgtgag  aatcttccc  aagccccacc  ctccccaga  1740
gcaccctccc  ctctgtctc  caccctacc  caagttctc  cacagtcact  cctgccccat  1800
gctcatgccc  cctccagtt  ctgtctctgc  ccctctccc  tcccacacc  agacccaaa  1860
caggctgttg  ggccagctgt  tcttgacct  cctcttttt  cttttggttc  cttgaccca  1920
gtgggctctc  actcccaca  ccgatatct  aaaatctgtt  ttgcctgctc  ttgggggtgcc  1980

```

ES 2 425 115 T3

actgctcccc ctccagcatt actccttttg gcaggctcct cctcaggctg agaatctccc 2040
cctctacctt ggTTTTctct ctctggccag cacccccact ccttgctttg tttttaattt 2100
ttaacttttg tttgggtacg tagtagatat gtatgtatat atttatgggg tacatgggat 2160
atTTtgacac aggcctacaa tatgtcataa tcacatcagg gtaaattgggt tatctatcac 2220
aacaagcatt tatoctttct ttgtgctaca aacaatccca ttatgctctt tcagttattt 2280
ttaaattgtac aataaattat tgttggctgt actcaccctg ctgtgctatc tactagatct 2340
tattcattct aactatattt ttgtacctat taaccatccg cactccccca ctccccacta 2400
cccttctcag cctctggtaa tcgtcattct attgtctctc cccatgaggt ccattgtttt 2460
aatttttggc tgccacaaat aagtgagaac atgcgaagt ttgtctctctg ggctggggc 2520
ttatttcact tcacatgatg acctccagtt ctttgcaaat gacatgggtg ctgaatagta 2580
ctccacatac acgtgtgcac cacattttct ttctccattc gtctgttgat ggacacttag 2640
gtcgtttgca gatcttggct atTTtgaata gtgctgcaat aaacatggaa aagtagatag 2700
ctctttaata taccgatttc ctttcttttg ggtatatgcc taacagtggg agtgctggag 2760
catatgacag ctctattata ttttagttt ttggaagaac ctccacatta ttcccacag 2820
tggttatact agtttacgtt cccaccaaca gtgtacaagg gttctctttt gctacatcct 2880
cgccaggatt ccttattgcc tgtcttctgg ataaaagcca gtttatctgg ggtgggatga 2940
tatctcgtag gagttttgat ttgccttcat ctgatgacga atgatgttga gcacctttt 3000
atatacctgt ttgccatttg tatgtcttct tttgagaaat gactattcag atcttttctg 3060
catttttaag ttggattatt agatattttt cctatagagt tgtttgagat ccttatatgt 3120
tttggttact aatcctttgt cagatgaata ttttgaaaat attttctccc attcttggat 3180
ggtctcttca ctttgtttat tgtttccttt gctgtgcaga agctttttaa cttgatatga 3240
tcccatttat gcatttttac tttggttggc tgtgcttgtg gggattact taaaaaatct 3300
ttgccagtc aatatcttag agagtttccc caatgttttc ttttatagtt ttcatagttt 3360
gaggtcatag atttacatct ttaatccttt ttgattggat ttttatatgt ggtgagagat 3420
aggttccagt ttcattcttc tgcataagga tatctagttt cccagcacc atttattgaa 3480
gagactctcc tttgcctgt atgtgttctt ggtaactttg ttagaataaa cttcactgta 3540
gatatactga tttgtttctg ggttctctat tctgtttcat tggccctgt gtctgtttt 3600
atgccactac cgtgctgttt tgattactct agctctgtag tataatttga agtcagataa 3660
tgtgattcct ctagttttgg tctttttggt cagggtagct ttatctattc tgggttttt 3720
gtgattccat atacatttta ggattgtttt tctatttctg tgaagaatgt cattgggtgt 3780
ttgatagcaa ttgcattgaa tttgtagatt gctttgggta ggatggatat tttaacaaaa 3840
ttgattcttc cggctgggca cgggtggetca ctctgtaat cccagcact tgggagccg 3900
agtcagggtg atcacttgag atcaggagtt caagaccagc ctgatcaaca tggagaaacc 3960
ccgcctctac taaaaataca aaattagcca ggcgtggtgg catatgcctg taatcccagc 4020
tactcaggaa agctgaggca ggagaatcgc ttgaaccag gaggcagagg ttgtgggtgag 4080
ctgagattgc accattgcac tccagcctgg gcaacaggag caaaactcca tctcagaaaa 4140
taaaaataaa cattgattct tccagtcctat gaacatggaa tgccttttcc attttttctg 4200
tctcttcaa tgttttgcac cagtgtttta tagttttat tggagagatc tttcacttct 4260
tcagttaagt ctattcctag gtattttatt ttattttag ctaatgaaaa tgggattcgt 4320
ttcttgattt ctttttcaga ttatttctg tttagcacata gaaatgctat tgatttttgc 4380
atgttgattt tgtatcctgc aactttactg aatttgttct tcagttctaa tagttttttg 4440
gtggagctt taggttttcc aaatatcaga ccacatgat tgcaaacaag gataatttga 4500
cttcttcttt tccaattttg atgcccttta tttccttctc ctgtcagatt gctctagcta 4560
ggacttgcag tattgtgttg cataactgta gtgaaagtag tcatccttgt cttgttccag 4620
atcttaaaga aaaggctttc agttttcccc cattcagtat gttactagct gtgagttgtc 4680
atataaggct tttattatat tgaggctctgt tccttgtata ctcagttttt tttagatttt 4740
tatcatgaag ggatgttaaa cttatcaaat gctttttcag tatcaattga aatggtgata 4800
tggcttttgt cctttattct gttgatacga tgtattacat tgattgattt gtgtatgcat 4860
acctggaata cattccactt ggtcatgaag aatgatcttt ttaataact gttgaatgtg 4920
gtttgctagt atttcattga tgatatttgc ctcaatgttc atcagggata taggcctgta 4980
gttttctttt tttgatgtgt ctttgcctga ttttgatac aggatattcc tggctttgta 5040
aatgagttt ggaagtattc cctcctctc tgtttttcag aacaatttga ataggactga 5100
tatttcttgt tctttaaocg ttttaattgt gtaaattata cattacataa attttactgt 5160
tttaaccgct ttttaagtga tactcgggtg cattagatac attcacattt ttgtgcaacc 5220
caaaactctg taccatttaa tgggtaactc cccattctc cctacctctg gccctggta 5280
accatcattc tactttttgt ttctatgaat ttgaccactc taggtacctc atttaagtag 5340
aatcgtgtaa tgtttgtctt tttgattctg gcttatttca cttataatat ttcgaggttc 5400
atccaggttg tagtatgggt cagattttca ttcttttaa tgatgaataa tactattat 5460
atgtatgtac cacaccttgg ttatccattc ctcagacaat ggacacttgg gttacttcta 5520
ccttttggat atttggcaat atttcatttc tcttgggtat atatttatt cttttgagta 5580

tttcttttgg	gtatatatcc	agaaatagaa	ttgttggatc	atacggatt	tcatttttta	5640
atttttagag	gaatcaccat	agtgttttcc	attgcaggcg	tgccattttg	tatttctaga	5700
agcagtatac	aggggcttca	gtttctctac	ctccttgcca	aacttgctgt	ttgtgtgtgt	5760
gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgata	atagccacc	tgattgggtt	5820
gaagtgggat	ctcattgtgg	tttggatttg	cattttccta	atgagtactg	atattgagca	5880
tcttttcatg	tgtttattga	tcatttgtat	attttctttg	aagaattggc	cattgaagtc	5940
ttgccatttt	ttctccccc	catagcttct	catggctatt	ttgccatttt	ttgagtgggt	6000
tgactgtttt	gttgtttttg	tcaaactttt	ttgcatattc	tggaaactaa	tctctctctt	6060
tttctttttt	tttttttttt	ttttttttga	gatggagtct	tgctctgttg	cccaggetgg	6120
agtgcagtgg	cacgatctca	gctcactgca	agctccacc	gctagcttca	tgccattctc	6180
ccacctcagc	ctccctagta	gctgggacta	caggcgcccg	ccaccacacc	cggctaattt	6240
tttgatattt	tagtagagat	agggtttcac	catgtagacc	aggatggctc	caatctcctg	6300
acctggtgat	acaccgcct	cggcctccca	aagtgtctga	attacaggct	tgagccacca	6360
cgctggcct	tctggaagct	aatctcttat	cagatataatg	acttgcaata	tttatttcat	6420
ttcaggggtt	gattgctttc	tcactctgat	tgtgcccttt	gatgcacaga	tattttgaat	6480
ttttcatgag	tccagtttgt	cagttctttc	tattctatct	gtgctttggc	gtcataacca	6540
tgaaagcaact	gtcaaaccct	atgtcatgaa	cattataccc	aatgtttttt	tctaagatat	6600
ttttatgttt	tagttcttga	gttttagagtt	taggtctttg	attcattttg	agttaatttt	6660
tgtatatagt	acaaattaag	ggtccaattt	tatattattt	gaacatccag	ttcccccagc	6720
actatttgc	gaaaagatgg	acttactctt	tgataccctg	tcacctgccc	acccagttgg	6780
acactagctg	gtccatccaa	ttgctgtcct	ggggccttgt	catgccactc	ttccactttg	6840
aaccaagcc	cacatcattg	ctccctctg	ggatactgac	cccactataa	acttctctag	6900
ggctacaacc	ttcctacccc	ttgtgctca	tgaccacccc	ctcccttgtc	cccaccatgc	6960
ccatgatgag	tcttttctca	aggcagctcg	ccttgctcc	atctcaccct	cacctgtgca	7020
ccacagccac	actggacatg	ggtccctctg	agcctgagtc	ccttccatt	cccactgtcc	7080
cctctggcaa	gaccttccct	ccaacactgc	cttcatgctc	ctcccttgc	cctgcagggc	7140
agcctctccc	cttggccctt	attcccttag	ggggcttgtg	gccaccagct	cctggcacct	7200
gacctacaag	tttgccatct	tcattccccc	ttcttctgtt	catcagcccc	ctcctctatc	7260
ctcccacctt	cacagttttc	cttgtatag	aaatcttctg	tcttgtcctt	ttgcccattg	7320
gcatttctctg	cctcctcagg	gaggtcggga	cagcagacct	gtgtgttaaa	catcaatgtg	7380
aagtattttc	caggaagaag	ttcacctgt	gatttctct	tcccagagc	cccacagtct	7440
tcgttacaac	ctcatgggtg	tgtcccagga	tggatctgtg	cagtcaagggt	ttctcgtga	7500
gggacatctg	gatggtcagc	ccttctctg	ctatgacagg	cagaaacgca	gggcaaagcc	7560
ccagggacag	tgggcagaag	atgtcctggg	agctgagacc	tgggacacag	agaccgagga	7620
cttgacagag	aatgggcaag	acctcaggag	gacctgact	catatcaagg	accagaaagg	7680
aggtgagagt	cggcaggggc	aagagtaatg	ggaggccttc	tccaggaaag	ttggagacag	7740
agagcagggg	cctgtctctt	cccgtctgat	ctggctgggg	gtggggatga	ggaatagggt	7800
cagggagggt	cagcaggggtg	gtgagccgga	actcagccca	cacagggagg	catggaggag	7860
ggccagggag	gggtcgccgc	tgggtctgat	tcctcacttg	ggtggaaagg	tgatgggttc	7920
gggaatggag	aagtcactgc	tgggtggggg	caggtctgca	ttccctccag	gagattaggg	7980
tctgtgagat	ccatgaagac	agcagacca	ggggctccc	gcatttctac	tacaatgggg	8040
agctcttctt	ctcccaaaac	ctggagactc	aagaatcgac	agtgccccag	tcctccagag	8100
ctcagacctt	ggctatgaac	gtcacaatt	tctggaagga	agatgccatg	aagaccaaga	8160
cacactatcg	cgctatgcag	gcagactgcc	tgcagaaact	acagcgatat	ctgaaatccg	8220
gggtggccat	caggagaaca	ggtaccgacc	ctggccaggg	gctctactgt	tcccgcaatt	8280
ctgctagagt	tgctctgcct	cccagctctg	tccagggaaa	ccctccctgt	gctatggatg	8340
caggcgtttc	ctgttggcat	attgtgtcct	gatttgcctc	tcctgttaga	gccattggat	8400
aaagacagtg	ggtctgggac	tgaactgtcc	agtgttgtaa	tctgggaaag	cagtgggccc	8460
tctgacagaa	gcctgagcct	gggttgggag	ttaggcagga	gaggaagccc	tcagggccag	8520
ggctgcccc	tctgctccc	ggcctgccc	tcccggagag	ttccctcctg	gccccatgac	8580
ccaggagtcc	acccttgaca	tcccctcct	cagcatcaat	gtggggatcc	cagagcctga	8640
ggccacagtc	ccaaggccca	tcctcctgct	agcctggagg	aattaggccc	cagggtgagg	8700
acagacttac	agaaggtctg	ggatctgtga	gggattcagc	cagagtgaga	acagtggaga	8760
ggagcagccc	tgttccctgc	atctccctta	gaggggagca	gggcttctact	ggctctgccc	8820
tttcttctcc	agtgcctccc	atggtgaatg	tcacctgcag	cgaggtctca	gagggcaaca	8880
tcacctgac	atgcagggct	tccagcttct	atccccggaa	tatcacactg	acctggcgct	8940
aggatggggg	atctttgagc	cacaacacc	agcagtgggg	ggatgtcctg	cctgatggga	9000
atggaacct	ccagacctgg	gtggccacca	ggattcgcca	aggagaggag	cagaggttca	9060
cctgctacat	ggaacacagc	gggaatcacg	gcaactcacc	tgtgccctct	ggtgagcctg	9120
gggtgaccct	ggagagggtc	aggccaggg	aggaacagca	gggacggctg	tggctctctg	9180

cccagtgtat aacaagtccc tttttttcag ggaaggcgct ggtgcttcag agtcaacgga 9240
 cagactttcc atatgtttct gctgctatgc catgttttgt tattattatt attctctgtg 9300
 tccttgtttg caagaagaaa acatcagcgg cagaggggtcc aggtgagaaa aggggacagt 9360
 ttctggagat gggaaagctc ctttctagge agtaggggtct cctcattgct cctgccaga 9420
 caagacgtag gtgacaaggc tgctggaaca ggggatggaa gctgggggat ttgggagggg 9480
 aatgggagct gcatctccat ctacacccat aagtgcctct caagccaggg ctggggcaag 9540
 gccttcgaat atccagctgt ggcctcctcc tgctgcaagt gaggagtggg cagcagggag 9600
 ggctgtggca cctgctctgt ccccatccca gcctctctgt ctctcgggct cactaggggtg 9660
 cgtccagggtg gggtgagttg ggaatcacgt gctgattgct gagggcctgg atgatcatgg 9720
 tgtcagaggg aggaaatagt aaagtggtct ctgacctggg gagggccaga aactggagag 9780
 gaatccaagg agaggcgggtg cccacccgtg tgccctcctc aggaggcact ttccaggttc 9840
 ccaccacctg gcctccctga gtttccttgc agatgacaca gatgaataga taagcagatg 9900
 tccttggggc atttgaggag cggggcccag cccctcatca gggcagttgt ggtccctgtt 9960
 ttcatcctac ctccagcgtg ttttcttctg cagtcctga gggacacagt ccccaggcgc 10020
 catctctttg aggctttgtt ctgtgctctg tggccttacc ttgccctccc tgagccaatt 10080
 tccttttctc aaggtggtca ctgcctggta agtttggagt aagggacggt cagaagcatt 10140
 tccccacag tcaggttgtt tgatggggga tgaaaagaga cagcagaagt tttgtgtttc 10200
 tgcaaaaaca gaggcagtgc aggggacagt gagaggctgg ggtgtccagg agacctgagt 10260
 ctggcggtag gggcgctggg ttctcatcct tgaacctaat tgactgtca gtcggcccct 10320
 catgcctgag cagatgggaa ggctcgtccc ctgccctgca gcaagagggc cctgtccagg 10380
 aggcacccac agcaggggca gtgcaggtct gtggtcactc ctgctctcac ctggcgctc 10440
 tcccgtggag ggattgtcac ttctggttcc ctgtgggagc gaatggtttc ctctaggtc 10500
 actggggttt tggccaggaa aagggtatga aattcatgtg ccagtttatc aaaattcctg 10560
 ctttcaatgt tgatgtccaa taaagatgtt cgtaatttca gctctataat cttaatagga 10620
 tttcctctaa tactgctgtt gtaaagcata ttaaataaaa caggaactca aatttggagc 10680
 cccctctcca gaagggctctg tgtggagatg gtggctgtgg cagcggcagt tcccaggtgc 10740
 agagggtagg cagagcagc ctcaggctaa ggggtctccc ctactccacg tggagaaaag 10800
 tccttgttag ttgcaagggc agtgccctgg gtggaatccc tgctagggac agagcaggaa 10860
 ggccctcagc cctcaccaag cagcagccct ggggtgaagt aagtggacca ggagtaagt 10920
 gaccaggcag gagcagtagt gactcaacag caggtcacag gcctaggtgg gtgctgaagg 10980
 tcatgggagg ccaggcctcc tcgagcaagg tgggggttcc cagggctatg tcaggtgcag 11040
 atcctgtggc agccatgtct ttccatgtg ggctgctgg gccccccagg cttcctgatg 11100
 ggggtcccag ttaggagctg cctgctcagg gctgggaggg gaggagtgct gagctgcaga 11160
 tagagggcag ggcccacagt gggcagggcc tgccctgggtg tgcaagtgcc tctgcaggag 11220
 aggagggcct ggggactgag agcaagggtc agggcctctc ttgggggagg cctctcactg 11280
 taacaggact ggtcaggcct gagaggaggg cactgggttc cctcttgggt cttgtccttt 11340
 tgtcttgggg ccctttcact ccctgcagg tgagtggtag gcacaggaca ggggctgatg 11400
 ttgatggagt gatgggagag aactgacag ggctgggaaa agcaaggagg gaggaagaa 11460
 aaagtggggg cctcatcttc tctcagagaa agggtgaatc tgatttggg gcaactgaag 11520
 agagaaaagt ccttagggaa taaacacaac actgcacca gtggagcatt taccctgtt 11580
 cctcttctcc agagcttgtg agcctgcagg tcctggatca acaccagtt gggacaggag 11640
 accacaggga tgcagcacag ctgggatttc agcctctgat gtcagctact gggctcactg 11700
 gttccactga gggcgctag actctacagc caggcggcca ggattcaact cctgcctgg 11760
 atctcaccag cactttccct ctgtttcctg acctatgaaa cagaaaataa catcacttat 11820
 ttattgttgt tggatgctgc aaagtgttag taggtatgag gtgtttctg ctctgccacg 11880
 tagagagcca gcaaagggat catgaccaac tcaacattcc attggaggct atatgatcaa 11940
 acagcaaat gtttatcatg aatgcaggat gtgggcaaac tcacgactgc tcctgccaac 12000
 agaaggtttg ctgagggcat tcactccatg gtgctcattg gagttatcta ctgggtcatc 12060
 tagagcctat tgtttgagga atgcagtctt acaagcctac tctggacca gcagctgact 12120
 ccttcttcca cccctcttct tgctatctcc tataccaata aatacgaagg gctgtggaag 12180
 atcagagccc ttgttcacga gaagcaagaa gccccctgac cccttgttcc aaatatactc 12240
 ttttgtcttt ctctttatcc ccacgttccg cctttgttca gtccaataca gggttgtggg 12300
 gcccttaaca gtgccatatt aattggtatc attatttctg ttgtttttgt ttttgtttt 12360
 gtttttgttt ttgagacaga gtctcactct gtcaccaggg ctgcagttca ctggtgtgat 12420
 ctcagctcac tgcaacctct gcctcccagg ttcaagcact tctcgtacct cagactcccg 12480
 aatagctggg attacagaca ggcaccacca caccagcta atttttgtat tttttgtaga 12540
 gacgggggtt cgccaagttg accagcccag ttaaaactc ctgacctcag gtgatctgcc 12600
 tgccctggca tcccaagtg ctgggattac aagaaatgag caccgtgctt ggcctatttt 12660
 attatattgt aatatatttt attatattag ccacatgcc tgtcctatct tcttatgttt 12720
 taatatattt taatatatta catgtgcagt aattagatta tcatgggtga actttatgag 12780
 tgagtatctt ggtgatgact cctcctgacc agcccaggac cagctttctt gtcaccttga 12840
 ggtcccctcg ccccgtcaca ccgttatgca ttactctgtg tctactatta tgtgtgcata 12900
 atttataacc taaatgttta ctctttaa 12930

ES 2 425 115 T3

<210> 5
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> configuración variada
 <222> 26
 <223> n = A/G
 <400> 5

10 gtgggcagaa gatgtcctgg gagctnagac ctgggacaca gagaccgagg a 51
 <210> 6
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> configuración variada
 <222> 26
 <223> n = A/G/C
 <400> 6

20 caggggctcc cggcatttct actacnatgg ggagctcttc 51 ctctcccaa a
 <210> 7
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> configuración variada
 <222> 51
 <223> n = A o T
 <400> 7

30 tttgtttctc cttaagtggc attttgactg tccattgcag cattctgac ntaaaagaca 60
 tccactttgc taatgcacac gagatttctct tagttgaagt a 101
 <210> 8
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <221> configuración variada
 <222> 26
 <223> n = A/G
 <400> 8

40 cttggcaat tctataggt gagcntaaa ggtgggctcc aggtaggat g 51
 <210> 9
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> *Homo sapiens*
 <400> 9
 cctgctccga ttc 13

ES 2 425 115 T3

<210> 10
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> *Homo sapiens*

<400> 10
 ccctgctctg attc 14

10 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> *Homo sapiens*

15 <400> 11
 atcagtcagt ggcccagaag ac 22

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> *Homo sapiens*

<400> 12
 gggacacaca agcatcaagg ata 23

25 <210> 13
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 30 <221> configuración variada
 <222> 452
 <223> n = C o G

<400> 13

ttcattcttc atcaaatac agcataaaaa tagttttccc ctgggtcctt gggctttcat 60
 ttctgaaggc tcccatgtca cctaaaactt tgattaaata aatgtattat gcttttctct 120
 tgtaaatctg tcttttatta taggagtatt ggccataacc cttatgatgg gtcaggaagg 180
 gatcaccctt ttctgcccct acagaaataa tagctaagac tagtaaagca taaaaggcaa 240
 aggggcaggc cctcaagtag agaagaacag gagaaatagc tcatacacac ccagaatggt 300
 acttacatgt ccctccatgt tacaccaaga cccctcaggg accttgtgcc tggggagaga 360
 agtgggtctgc cccatgcaac agtgggcttt accccgggtc accaccagcc ccagctcaa 420
 cccctctaac actctccaag taaaatcaca tnagtagcag taataatatt tgaggtgaca 480
 agttggtatt atctcaaact taggaaaagt gaataaagtc atctttagaa actgcttttt 540
 ttaaaccctt gtaaccttgc aagctaagtg aaaatgggct catgtatgag aatgttcgtg 600
 ttagacattt tttgggttcg acaaaactac gaaacaaacc aatccccatc acagatttat 660
 35 tagaatatat tgatacaata gaatattaca tcatattttt tttaaaaaca ttactggtac 720

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método de cribado de un sujeto humano como una ayuda para predecir la respuesta a la administración de abacavir, que comprende determinar si el sujeto tiene un alelo "A" en el sitio polimórfico G(-237)A de TNF α (SEQ ID NO:1), en el que la presencia de dicho genotipo de TNF α indica que el sujeto tiene mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir, comparado con el riesgo de individuos sin ese alelo.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, que comprende además determinar si el sujeto tiene una o dos copias de un alelo HLA-B57.
- 10 3.- Un método de cribado de un sujeto humano como una ayuda para predecir la respuesta a la administración de abacavir, que comprende determinar si el sujeto tiene un alelo HLA-B57, en el que la presencia de dicho genotipo de HLA indica que el sujeto tiene mayor riesgo de una reacción de hipersensibilidad al abacavir, comparado con el riesgo de individuos sin dicho alelo.
- 4.- Un método según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que dicho genotipo es un genotipo que incluye una o dos copias del alelo HLA-B*5701.
- 15 5.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicho genotipo de HLA se determina mediante un método que detecta la presencia o la ausencia de la secuencia de ADN alélica de HLA.
- 6.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sujeto no ha sido tratado previamente con abacavir.
- 7.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho sujeto ha sido tratado previamente con abacavir.
- 20 8.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sujeto ha sido diagnosticado con un trastorno seleccionado de una infección por VIH, enfermedad del VIH, SIDA, y complejo relacionado con SIDA.