

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 281**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/GB2015/051618**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15728100 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3152325**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico de la neuralgia del trigémino**

30 Prioridad:

03.06.2014 GB 201409851

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

16.04.2020

73 Titular/es:

**CONVERGENCE PHARMACEUTICALS LIMITED
(100.0%)**

**90 High Holborn
London WC1V 6XX, GB**

72 Inventor/es:

MORISSET, VALERIE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 754 281 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de diagnóstico de la neuralgia del trigémino

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de la neuralgia del trigémino en un sujeto humano y también proporciona un procedimiento para identificar a los pacientes más propensos a responder a la terapia y a los kits para su uso en dichos procedimientos.

10

Antecedentes de la invención

Los trastornos de dolor paroxístico se refieren a los trastornos del dolor que se caracterizan por ataques de dolor. Tales trastornos típicamente incluyen la neuralgia del trigémino (TN), la eritromelalgia hereditaria (IEM), el trastorno

15

La neuralgia del trigémino (NT) es una afección de dolor facial severo episódico poco común con una incidencia de 4,0 a 4,7 por 100.000 personas al año (Obermann et al (2007) *Cephalalgia* 27(6):504-509; Katusic et al (1991) *Neuroepidemiology* 10(5-6):276-281). La neuralgia del trigémino puede aparecer a cualquier edad, pero la aparición de la enfermedad es por encima de los 40 años en más del 90 % de los casos con un pico de aparición entre los 50 y 70 años de edad (Katusic et al. supra; van Kleef M et al (2009) *Trigeminal neuralgia*. *Pain Pract* 9(4):252-259). Sin embargo, los datos recientes de la práctica de la atención primaria validados por expertos sugieren una tasa de incidencia de 12,6 por cada 100.000 años/persona con una edad media al momento del diagnóstico de 51,5 (SD 17,6) con un predominio femenino del 71 % (Koopman et al (2009) *Pain* 147(1-3):122-127). El sistema de clasificación de la International Headache Association tiene como objetivo establecer criterios de diagnóstico de la TN basados en la etiología (IHS: IHS Classification ICHD-111 Versión Beta. 2013, 33 (9), 629-808). Sin embargo, hay un problema en distinguir la NT primaria y secundaria, porque a menos que un paciente con neuroimagen normal venga a una operación, no está claro si su NT es causada por una compresión vascular. Para adaptarse a esta incertidumbre diagnóstica, el término neuralgia "clásica" se utiliza actualmente para casos con neuroimagen normal y compresión potencial de la raíz proximal del nervio trigémino por un asa vascular. La NT clásica es el tipo de NT más común, y se cree que la desmielinización secundaria, probablemente mediada por daño isquémico microvascular, resulta en un umbral de excitabilidad más bajo de las neuronas afectadas. Esto promueve la generación ectópica inadecuada de impulsos nerviosos espontáneos junto con la transmisión efática anormal y no sináptica a las neuronas adyacentes (Obermann et al (2007) *Neurology* 69(9):835-841; Prasad y Galetta (2009) *Neurologist* 15(2):87-94).

35

A diferencia de muchos otros dolores neuropáticos, la NT produce paroxismos recurrentes de dolor de corta duración pero muy intenso en la distribución de una o más ramas del nervio trigémino. En pacientes con el tipo clásico, los ataques aparecen repentinamente, duran hasta 2 minutos y desaparecen repentinamente. Entre los ataques, los pacientes suelen ser asintomáticos, aunque puede haber un ligero dolor después (Zakrzewska JM (2002) *Clin J Pain* 18(1):14-21). Se producen numerosos ataques al día, pero actualmente no hay estudios que detallen cuántos paroxismos se producen al día. En un RCT reciente de toxina botulínica A en 42 pacientes con NT, se midió la frecuencia de paroxismos y el promedio fue de 20 al día, pero el intervalo fue de 4-100 (Wu et al (2012) *Cephalalgia* 32(6):443-450). Los pacientes también informan que estos pueden ser tan frecuentes que parece un ataque largo. Los ataques pueden variar en intensidad y pueden describirse como disparos, descargas eléctricas que anotan puntuaciones máximas en las escalas o simplemente "punzadas" Estos ataques pueden durar entonces semanas o meses. Especialmente en las primeras etapas del trastorno, es muy común que los ataques se detengan completamente y que los pacientes tengan semanas, meses o incluso años sin dolor (Rothman y Monson (1973) *J Chronic Dis* 26(5):303-309). Sin embargo, con el tiempo los períodos de remisión se acortan. Actualmente, no existen estudios de historia natural ni factores pronósticos conocidos que ayuden a determinar la duración de estos períodos, aunque Taylor et al. (Postgrad Med J 1981, 57:16-18) mostró que la carbamazepina se volvió menos efectiva con el tiempo. Esto puede deberse al curso natural de la enfermedad, pero también puede deberse a las propiedades farmacológicas de autoinducción de la propia carbamazepina. El dolor es provocado por actividades de toque ligero, por ejemplo, lavarse, comer, hablar y vientos fríos, pero también se producen ataques espontáneos de dolor. Un estudio que midió la aparición de dolor evocado o espontáneo sugirió que la oxcarbazepina fue más efectiva para reducir la primera (Beydoun et al(2002), 58:p02.083). Aunque se producen ataques de dolor durante la noche, son menos comunes. Por lo tanto, incluso cuando no hay dolor, los pacientes viven con miedo de que el dolor regrese. Por lo tanto, estas características dificultan la evaluación del efecto de los tratamientos. Los criterios diagnósticos para la NT utilizados con mayor frecuencia son los de la Sociedad Internacional de Cefalea, la Clasificación Internacional de Trastornos de Cefalea (ICHD) (Anon (2004) *Cephalalgia* 24(Suppl 1):9-160), y ahora se han actualizado con una especificación más clara de las variantes de la NT, es decir, los pacientes que pueden tener, además del dolor punzante, un dolor más prolongado, y se cree que éstos tienen una patofisiología potencialmente diferente (Anon (2013) *Cephalalgia* 33(9):629-808).

60

Las pautas actuales en el tratamiento de la neuralgia del trigémino recomiendan los bloqueadores de los canales de sodio, como la carbamazepina o la oxcarbazepina, como tratamiento de primera línea. Sin embargo, los medicamentos actualmente disponibles a menudo se asocian con una tolerabilidad deficiente, lo que resulta en un control del dolor que no es óptimo.

La eritromelalgia hereditaria (IEM) se caracteriza clínicamente por dolor urente y enrojecimiento que generalmente se concentra en las extremidades distales, precipitado por calor leve y aliviado por enfriamiento, y es causado por mutaciones Nav1.7 que hiperpolarizan la activación, desactivación lenta y mejoran la respuesta de rampa de canal (Dib-Hajj et al (2010) Annu Rev Neurosci 33:325-347).

El trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD) se caracteriza por dolor perirrectal, periocular o perimandibular, a menudo desencadenado por la defecación o la estimulación de la parte inferior del cuerpo (Fertleman et al (2007) Neurology 69(6):586-595), y se ha relacionado con las mutaciones de Nav1.7 que perjudican gravemente la inactivación rápida (Fertleman et al (2006) Neuron 52(5):767-774).

Neuropatía de Fibras Pequeñas (SFN), que involucra fibras nerviosas periféricas finamente mielinizadas y no mielinizadas (Lacomis D: (2002) Muscle Nerve 26(2):173-188; Lauria G (2005) Curr Opin Neurol 18(5):591-597), presenta un cuadro clínico que está dominado característicamente por dolor neuropático y síntomas autonómicos (Stewart et al (1992) Muscle Nerve 15(6):661-665), junto con la preservación de la fuerza normal, los reflejos tendinosos y el sentido de la vibración, y los estudios de conducción nerviosa normal (NCS), que descartan la posibilidad de implicación de fibras grandes. El diagnóstico de SFN puede confirmarse mediante la demostración de una densidad reducida de fibras nerviosas intraepidérmicas (IENFD) en biopsias de piel y/o pruebas sensoriales cuantitativas anormales (QST) (Lauria et al (2010) Eur J Neurol 17(7):903-912, e944-909; Tesfaye et al (2010) Diabetes Care 33(10):2285-2293).

Por lo tanto, es necesario desarrollar una prueba objetiva, en particular una prueba rápida de genotipado, para la identificación de los trastornos de dolor paroxístico antes mencionados, como la neuralgia del trigémino, y también para identificar a los pacientes con más probabilidades de responder al tratamiento.

RESUMEN DE LA INVENCION

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de diagnóstico de la neuralgia del trigémino en un sujeto humano donde dicho procedimiento comprende detectar la presencia de una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA 1A* y/o del gen *CACNA 1B* de dicho sujeto.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un kit para el diagnóstico de un trastorno de dolor paroxístico que comprende instrucciones para utilizar dicho kit según los procedimientos definidos en el presente documento.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento de tratar un trastorno de dolor paroxístico en un sujeto humano donde dicho procedimiento comprende:

- (a) detectar la presencia de una o más variaciones genéticas en el gen *CACNA1A* y/o en el gen *CACNA 1B* de dicho sujeto; y
- (b) administrar un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 a dicho paciente identificado como poseedor de dichas una o más variaciones genéticas.

Así, según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para predecir si un paciente responderá al tratamiento con un bloqueador del canal de sodio Nav1.7, donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra biológica de un paciente; y
- b) detectar la presencia de una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA 1A* y/o del gen *CACNA 1B* de dicho sujeto;

de modo que la presencia de dichas una o más variaciones genéticas es indicativa de que un paciente responderá al tratamiento con un bloqueador del canal de sodio Nav1.7.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 para su uso en el tratamiento de un trastorno de dolor paroxístico en un paciente, caracterizado porque dicho paciente ha sido seleccionado por tener una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA 1A* y/o del gen *CACNA1B*.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno de dolor paroxístico en un paciente donde dicho procedimiento comprende las etapas de seleccionar un paciente que tiene una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o del gen *CACNA1B* seguido por administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 a dicho paciente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 describe los resultados de un estudio de 7 semanas con CNV1014802 (un bloqueador del canal de sodio selectivo estado-dependiente Nav1.7 novedoso) en pacientes con neuralgia del trigémino.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Según un primer aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento de diagnóstico de un trastorno de dolor paroxístico en un sujeto humano donde dicho procedimiento comprende detectar la presencia de una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o del gen *CACNA1B* de dicho sujeto.

El estudio descrito en el presente documento ha identificado sorprendentemente una serie de variaciones genéticas dentro de los genes *CACNA1A* y *CACNA1B* en pacientes con neuralgia del trigémino en comparación con las secuencias de tipo silvestre. Por lo tanto, estos mutantes tienen gran utilidad en el diagnóstico de los pacientes que tienen o es probable que padezcan neuralgia del trigémino.

Las referencias en el presente documento a "trastornos de dolor paroxístico" se refieren a trastornos de dolor que se caracterizan por ataques de dolor. En una realización, el trastorno de dolor paroxístico se selecciona de entre: neuralgia del trigémino (TN), eritromelalgia hereditaria (IEM), trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD) y neuropatía de fibras pequeñas (SFN). En una realización adicional, el trastorno de dolor paroxístico se selecciona de la neuralgia del trigémino.

Las referencias en el presente documento al "gen *CACNA1A*" se refieren al gen de subunidad alfa 1A, tipo P/Q, dependiente del voltaje, del canal de calcio (también conocido como Cav2.1). El gen *CACNA1A* pertenece a una familia de genes que codifican el poro que forma subunidades alfa de canales de calcio. Estos canales, que transportan átomos de calcio cargados positivamente (iones calcio) a través de las membranas celulares, juegan un papel clave en la capacidad de una célula de generar y transmitir señales eléctricas. Los iones calcio están involucrados en muchas funciones celulares diferentes, incluyendo la comunicación de célula a célula, la tensión de las fibras musculares (contracción muscular) y la regulación de ciertos genes.

El gen *CACNA1A* proporciona instrucciones para formar una parte (la subunidad alfa-1) de un canal de calcio llamado Cav2.1. Esta subunidad forma el orificio (poro) a través del cual pueden fluir los iones calcio. Los canales Cav2.1 juegan un papel esencial en la comunicación entre las células nerviosas (neuronas) del cerebro y la médula espinal. Estos canales ayudan a controlar la liberación de neurotransmisores, que son sustancias químicas que transmiten señales de una neurona a otra. Se cree que los canales de Cav2.1 también están involucrados en la supervivencia de las neuronas y la capacidad de estas células para cambiar y adaptarse con el tiempo (plasticidad).

Cerca de un extremo del gen *CACNA1A*, un segmento de tres unidades estructurales del ADN (nucleótidos) se repite varias veces. Esta secuencia, que se escribe como CAG, se denomina triplete o repetición de trinucleótidos. En la mayoría de las personas, el número de repeticiones CAG en este gen oscila entre 4 y 18.

El gen *CACNA1A* se localiza en el brazo corto (p) del cromosoma 19 en la posición 13 (19p13). Más precisamente, la ubicación molecular del gen *CACNA1A* está en el cromosoma 19: pares de bases 13.206.441 a 13.506.459.

CACNA1A se ha relacionado anteriormente con ataxia episódica, migraña hemipléjica familiar, ataxia espinocerebelosa tipo 6 y migraña hemipléjica esporádica; sin embargo, no se ha proporcionado específicamente tal relación entre *CACNA1A* y los trastornos de dolor paroxístico, como la neuralgia del trigémino.

Las referencias en el presente documento al "gen *CACNA1B*" se refieren al gen de subunidad alfa 1B, tipo N, dependiente del voltaje, del canal de calcio (también conocido como Cav2.2). La proteína codificada por este gen es la subunidad formadora de poros de un canal de calcio dependiente del voltaje de tipo N, que controla la liberación de neurotransmisores de las neuronas. La proteína codificada forma un complejo con subunidades alfa-2, beta y delta para formar el canal activado de alto voltaje. Este canal es sensible a la omega-conotoxina-GVIA y a la omega-agatoxina-IIIa pero insensible a las dihidropiridinas. Se han encontrado dos variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen.

El gen *CACNA1B* se localiza en el brazo largo (q) del cromosoma 9 en la posición 34 (9q34). Más precisamente, la ubicación molecular del gen *CACNA1B* está en el cromosoma 9: pares de bases 140.772.241 a 141.019.076.

Las enfermedades asociadas con el *CACNA1B* incluyen el carcinoma de Krukenberg y la corea fibrilar de Morvan, y entre sus supervías relacionadas se encuentran la vía vesicular sináptica y el reordenamiento circadiano; sin embargo, no se ha proporcionado específicamente tal relación entre el *CACNA1B* y los trastornos de dolor paroxístico, como la neuralgia del trigémino.

Las referencias en el presente documento a "variación genética" se refieren a una diferencia o variación entre el código o secuencia genética de un sujeto humano en comparación con un código o secuencia genética de tipo silvestre o nativa. Se apreciará que las variaciones genéticas incluyen cualquier variación en el código genético de tipo silvestre o nativo del genoma de dicho sujeto humano bajo análisis. Ejemplos de tales variaciones genéticas incluyen: mutaciones (por ejemplo, mutaciones puntuales), inserciones, sustituciones, deleciones, cambios del marco de lectura, polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP), haplotipos, anomalías cromosómicas, variación del número de copias (NVC), epigenética e inversiones de ADN. En una realización, las variaciones genéticas se seleccionan de entre sustituciones, inserciones, deleciones y cambios del marco de lectura.

La intención de las referencias en el presente documento al término "polimorfismo de nucleótido único (SNP)" es referirse a la variación de la secuencia de ADN que se produce cuando un único nucleótido en el genoma (u otra secuencia compartida) difiere entre los miembros de una especie o entre cromosomas apareados en un individuo.

La intención de las referencias en el presente documento al término "haplotipo" es referirse a un conjunto de marcadores genéticos que se heredan juntos como consecuencia de su co-localización cromosómica. El haplotipo puede referirse a tan sólo dos variantes genéticas o a un cromosoma entero, dependiendo del número de eventos de recombinación que se hayan producido entre un conjunto dado de variantes.

En una realización, las variaciones genéticas se detectan dentro del gen *CACNA1A*. En una realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen *CACNA1A* y están entre el pb 13.300.000 y el pb 13.450.000 en el cromosoma 19, tales como entre el pb 13.318.000 y el pb 13.412.000 en el cromosoma 19.

En otra realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen *CACNA1A* y se seleccionan de entre una o más de:

- (a) una mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.671;
- (b) una mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.672;
- (c) una mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.707;
- (d) una mutación del marco de lectura en el pb 13.318.709;
- (e) una mutación de sustitución en el pb 13.318.811;
- (f) una mutación de inserción en el pb 13.319.691;
- (g) una mutación de inserción en el pb 13.319.712;
- (h) una mutación de sustitución en el pb 13.397.560;
- (i) una mutación de sustitución en el pb 13.409.407, y
- (j) una mutación de sustitución en el pb 13.411.451.

Esta realización se refiere a las mutaciones novedosas y raras (<10 % de la población general) identificadas dentro del gen *CACNA1A* en el estudio definido en el presente documento.

En otra realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen *CACNA1A* y se seleccionan de entre una o más de:

- (a) una mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.671;
- (b) una mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.672;
- (c) una mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.707;
- (d) una mutación del marco de lectura en el pb 13.318.709;
- (f) una mutación de inserción en el pb 13.319.691; y
- (g) una mutación de inserción en el pb 13.319.712.

Esta realización se refiere a las mutaciones novedosas identificadas dentro del gen *CACNA1A* en el estudio definido en el presente documento.

En aún otra realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen *CACNA1A* y se seleccionan de entre:

(b) una mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.672.

Esta realización se refiere a la mutación novedosa identificada dentro del gen *CACNA1A* en el 62 % de los pacientes con TGN en el estudio definido en el presente documento.

5 La mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.671 descrita en el punto (a) anterior se considera una mutación novedosa porque esta mutación no ha sido identificada previamente. En una realización, la mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.671 descrita en el punto (a) anterior comprende la sustitución y delección de la secuencia: CAG CAG CAG CAG CAG CAG GCG (SEQ ID NO: 1) con la secuencia: CCG. Por ejemplo, los primeros seis codones
10 que comienzan en la posición pb 13.318.671 son eliminados y en el séptimo codón el primer nucleótido del codón tiene una G sustituida por una C. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución y delección resulta en una mutación QQQQQQA(SEQ ID NO: 2)2320P.

15 La mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.672 descrita en el punto (b) anterior se considera una mutación novedosa porque esta mutación no ha sido identificada previamente. En una realización, la mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.672 descrita en el punto (b) anterior comprende la sustitución y delección de la secuencia: CCG CAG CAG con la secuencia: CCG. Por ejemplo, los dos primeros codones que comienzan en la posición pb 13.318.672 son eliminados y en el tercer codón el segundo nucleótido del codón tiene una A sustituida por una C. A nivel de proteína, esta mutación de delección resulta en una mutación PQQ2312P.

20 La mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.707 descrita en el punto (c) anterior se considera una mutación novedosa porque esta mutación no ha sido identificada previamente. En una realización, la mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.707 descrita en el punto (c) anterior comprende la sustitución y delección de la secuencia: CCC GCA GCA con la secuencia: CCA. Por ejemplo, los dos primeros codones que comienzan en la posición pb
25 13.318.707 son eliminados y en el tercer codón el primer nucleótido del codón tiene una G sustituida por una C. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución y delección resulta en una mutación PAA2316P. La mutación descrita en el punto (c) anterior se considera una mutación preferida para la monitorización porque los datos mostrados en el presente documento indican que esta mutación fue observada sorprendentemente en el 62 % de los pacientes con TGN.

30 La mutación del marco de lectura en el pb 13.318.709 descrita en el punto (d) anterior se considera una mutación novedosa porque esta mutación no ha sido identificada previamente. En una realización, la mutación del marco de lectura en el pb 13.318.709 descrita en el punto (d) anterior comprende la sustitución de la secuencia: CTGCG con la secuencia: C. Por ejemplo, los nucleótidos del segundo al quinto después de la posición pb 13.318.709 son eliminados,
35 lo que causa un cambio del marco de lectura. A nivel de proteínas, esta mutación del marco de lectura resulta en la codificación de diferentes aminoácidos después del número residuo 2312.

La mutación de sustitución en el pb 13.318.811 descrita en el punto (e) anterior se considera una mutación rara porque esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de 0,02. A esta mutación se le ha asignado previamente el
40 número de identificación: rs147221323. En una realización, la mutación de sustitución en el pb 13.318.811 descrita en el punto (e) anterior comprende la sustitución de la secuencia: GCG con la secuencia: ACG. Por ejemplo, el primer nucleótido que comienza en la posición pb 13.318.811 tiene una G sustituida por una A. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación A2284T.

45 La mutación de inserción en el pb 13.319.691 descrita en el punto (f) anterior se considera una mutación novedosa porque esta mutación no ha sido identificada previamente. En una realización, la mutación de inserción en el pb 13.319.691 descrita en el punto (f) anterior comprende la inserción de un codón CAC después del codón CAT en la posición pb 13.319.691. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación H2219HH.

50 La mutación de inserción en el pb 13.319.712 descrita en el punto (g) anterior se considera una mutación novedosa porque esta mutación no ha sido identificada previamente. En una realización, la mutación de inserción en el pb 13.319.712 descrita en el punto (g) anterior comprende la inserción de un codón CCC después del codón CAC en la posición pb 13.319.712. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación de H2212HP.

55 La mutación de sustitución en el pb 13.397.560 descrita en el punto (h) anterior se considera una mutación rara porque esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de 0,07. A esta mutación se le ha asignado previamente el número de identificación: rs16027. En una realización, la mutación de sustitución en el pb 13.397.560 descrita en el punto (h) anterior comprende la sustitución de la secuencia: GGC con la secuencia: AGC. Por ejemplo, el primer nucleótido que comienza en la posición pb 13.397.560 tiene una G sustituida por una A. A nivel de proteína, esta
60 mutación de sustitución resulta en una mutación G1104S.

La mutación de sustitución en el pb 13.409.407 descrita en el punto (i) anterior se considera una mutación rara porque

esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de $<0,01$. A esta mutación se le ha asignado previamente el número de identificación: rs16024. En una realización, la mutación de sustitución en el pb 13.409.407 descrita en el punto (i) anterior comprende la sustitución de la secuencia: GAG con la secuencia: AAG. Por ejemplo, el primer nucleótido que comienza en la posición pb 13.409.407 tiene una G sustituida por una A. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación E1014K.

La mutación de sustitución en el pb 13.411.451 descrita en el punto (j) anterior se considera una mutación rara porque esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de $0,01$. A esta mutación se le ha asignado previamente el número de identificación: rs16019. En una realización, la mutación de sustitución a 13.411.451 descrita en el punto (j) anterior comprende la sustitución de la secuencia: GAA con la secuencia: GCA. Por ejemplo, el segundo nucleótido después de la posición pb 13.411.451 tiene una A sustituida por una C. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación E731A.

En una realización, se detectan las variaciones genéticas dentro del gen CACNA1B. En una realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen CACNA1B y están entre el pb 140.750.000 y el pb 140.950.000 en el cromosoma 9, como entre el pb 140.772.000 y el pb 141.000.000 en el cromosoma 9.

En otra realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen CACNA1B y se seleccionan de entre una o más de:

- (a) una mutación de sustitución en el pb 140.772.434;
- (b) una mutación de sustitución en el pb 140.772.440;
- (c) una mutación de sustitución en el pb 140.772.477;
- (d) una mutación de sustitución en el pb 140.777.306, y
- (e) una mutación de sustitución en el pb 140.918.181.

Esta realización se refiere a las mutaciones novedosas y raras (<10 % de la población general) identificadas dentro del gen CACNA1B en el estudio definido en el presente documento.

En aún otra realización adicional, las variaciones genéticas están dentro del gen CACNA1B y se seleccionan de entre:

- (b) una mutación de sustitución en el pb 140.772.440.

Esta realización se refiere a la única mutación novedosa identificada dentro del gen CACNA1B en el estudio definido en el presente documento.

La mutación de sustitución en el pb 140.772.434 descrita en el punto (a) anterior se considera una mutación rara porque esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de $0,062$. A esta mutación se le ha asignado previamente el número de identificación: rs187204220. En una realización, la mutación de sustitución en el pb 140.772.434 descrita en el punto (a) anterior comprende la sustitución de la secuencia: GGC con la secuencia: AGC. Por ejemplo, el segundo nucleótido después de la posición pb 140.772.434 tiene una G sustituida por una A. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación G17S.

La mutación de sustitución en el pb 140.772.440 descrita en el punto (b) anterior se considera una mutación novedosa porque esta mutación no ha sido identificada previamente. En un caso, la mutación de en el pb 140.772.440 descrita en el punto (b) anterior comprende la sustitución de la secuencia: GAG con la secuencia: AAG. Por ejemplo, el primer nucleótido en la posición pb 140.772.440 tiene una G sustituida por una A. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación E19K.

La mutación de sustitución en el pb 140.772.477 descrita en el punto (c) anterior se considera una mutación rara porque esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de $<0,001$. A esta mutación se le ha asignado previamente el número de identificación: rs201253748. En una realización, la mutación de sustitución en el pb 140.772.477 descrita en el punto (c) anterior comprende la sustitución de la secuencia: GGC con la secuencia: GTC. Por ejemplo, el segundo nucleótido después de la posición pb 140.772.477 tiene una G sustituida por una T. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación G31V.

La mutación de sustitución en el pb 140.777.306 descrita en el punto (d) anterior se considera una mutación rara porque esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de $<0,001$. A esta mutación se le ha asignado previamente el número de identificación: rs4422842. En una realización, la mutación de sustitución en el pb 140.777.306 descrita en el punto (d) anterior comprende la sustitución de la secuencia: AAC con la secuencia: AAG. Por ejemplo, el tercer nucleótido después de la posición pb 140.777.306 tiene una C sustituida por una G. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación N167K.

La mutación de sustitución en el pb 140.918.181 descrita en el punto (e) anterior se considera una mutación rara porque esta mutación sólo ha sido identificada con una frecuencia de <0,001. A esta mutación se le ha asignado previamente el número de identificación: rs11137342. En una realización, la mutación de sustitución en el pb 140.918.181 descrita en el punto (e) anterior comprende la sustitución de la secuencia: ACC con la secuencia: GCC. Por ejemplo, el primer nucleótido en la posición pb 140.918.181 tiene una A sustituida por una G. A nivel de proteína, esta mutación de sustitución resulta en una mutación T996A.

Los datos obtenidos del estudio descrito en el presente documento identificaron que el 32 % de los pacientes con neuralgia del trigémino tenían más de una de las mutaciones mencionadas anteriormente en el gen *CACNA1A* y el 41 % tenían más de una de las mutaciones mencionadas anteriormente en el *CACNA1B*. Así, en una realización, dicho procedimiento de diagnóstico comprende más de una variación genética (por ejemplo, dos, tres o más variaciones genéticas).

Los procedimientos de la descripción pueden utilizarse para detectar variaciones genéticas utilizando una muestra biológica obtenida del sujeto humano. Así, en una realización, el procedimiento comprende inicialmente la etapa de obtener una muestra biológica del sujeto humano.

El ácido nucleico puede ser aislado de la muestra de acuerdo a cualquier procedimiento bien conocido por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen muestras de tejido o cualquier biomaterial que contenga células o un biomaterial celular (es decir, una muestra de fluido corporal o de cabello). Pueden obtenerse muestras biológicas mediante procedimientos normalizados y pueden utilizarse inmediatamente o almacenarse, en condiciones apropiadas para el tipo de muestra biológica, para su uso posterior.

Los procedimientos de obtención de muestras biológicas son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, aspiraciones, secciones de tejido, extracción de sangre u otros fluidos, biopsias quirúrgicas o mediante aguja, y similares. Ejemplos de muestras biológicas adecuadas incluyen: sangre entera, suero sanguíneo, plasma, orina, saliva u otro fluido corporal (heces, líquido lagrimal, líquido sinovial, esputo), cabello, líquido cefalorraquídeo (LCR), o un extracto o purificación del mismo, o la dilución del mismo. Las muestras biológicas también incluyen homogeneizado de tejido, secciones de tejido y muestras de biopsia de un sujeto vivo. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, en su caso diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual. En una realización, la muestra biológica es sangre o suero. En una realización adicional, la muestra biológica es sangre. En caso necesario, la muestra podrá recogerse o concentrarse por centrifugación y similares.

Las células de la muestra pueden ser sometidas a lisis, por ejemplo, mediante tratamientos con enzimas, calor, tensioactivos, ultrasonidos o una combinación de los mismos. El tratamiento de lisis se realiza con el fin de obtener una cantidad suficiente de ácido nucleico derivado de las células del sujeto humano a detectar utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los procedimientos de preparación de plasma y suero son bien conocidos en la técnica. Puede utilizarse plasma o suero sanguíneo "fresco", o plasma o suero congelado (almacenado) y posteriormente descongelado. El plasma o suero congelado (almacenado) debería mantenerse de manera óptima en condiciones de almacenamiento de -20 a -70 °C hasta que se descongele y se utilice. El plasma o suero "fresco" debería refrigerarse o mantenerse en hielo hasta su utilización, realizándose la extracción de ácido nucleico (por ejemplo, ARN, ADN o ácido nucleico total) lo antes posible. A continuación se describen procedimientos ejemplares.

La sangre puede ser extraída por procedimientos estándar en un tubo de recogida, típicamente vidrio siliconado, ya sea sin anticoagulante para la preparación del suero, o con EDTA, citrato de sodio, heparina o anticoagulantes similares para la preparación de plasma. Si se prepara plasma o suero para su almacenamiento, aunque no es un requisito absoluto, el plasma o suero se fracciona primero de la sangre entera antes de ser congelado. Esto reduce la carga de ARN intracelular extraño liberado por la lisis de células congeladas y descongeladas, lo que podría reducir la sensibilidad del ensayo de amplificación o interferir con el ensayo de amplificación a través de la liberación de inhibidores a la PCR tales como porfirinas y hematina. El plasma o suero "fresco" puede ser fraccionado de la sangre entera por centrifugación, utilizando centrifugación suave a 300-800 veces la gravedad durante cinco a diez minutos, o fraccionado por otros procedimientos estándar. Deben evitarse altas velocidades de centrifugación capaces de fraccionar los cuerpos apoptóticos.

Se apreciará que la etapa de detectar una o más variaciones genéticas dentro de las regiones definidas en el presente documento comprenderá cualquier técnica adecuada para análisis genético.

El volumen de plasma o suero utilizado en la extracción puede variar, pero suelen ser suficientes volúmenes de 1 a 100 ml de plasma o suero.

Diversos procedimientos de extracción son adecuados para aislar el ácido nucleico. Procedimientos adecuados incluyen la extracción de fenol y cloroformo. Véase el documento de Maniatis et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d, Cold Spring Harbor Laboratory Press, página 16.54 (1989).

- 5 Numerosos kits comerciales también producen ADN y ARN adecuados, incluyendo, pero no limitados al mini kit de sangre QIAamp™, Agencourt Genfind™, Roche Cobas® Roche MagNA Pure® o fenol: extracción de cloroformo utilizando Phase Lock Gels® de Eppendorf, y el kit de extracción NucliSens (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia). En otros procedimientos, puede extraerse ARNm de muestras de sangre/médula ósea utilizando el kit MagNA Pure LC mRNA HS y Mag NA Pure LC Instrument (Roche Diagnostics Corporation, Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

- El ácido nucleico extraído de tejidos, células, plasma, suero o cabello puede ser amplificado utilizando técnicas de amplificación de ácido nucleico bien conocidas en la técnica. Muchos de estos procedimientos de amplificación también pueden utilizarse para detectar la presencia de variaciones genéticas simplemente diseñando cebadores o sondas de oligonucleótidos para interactuar o hibridar con una secuencia diana particular de una manera específica. A modo de ejemplo, pero no a modo de limitación, estas técnicas pueden incluir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), la PCR anidada y la reacción en cadena de la ligasa. Véase el documento de Abravaya, K., et al, Nucleic Acids Research, 23:675-682, (1995), branched DNA signal amplification, Urdea, M. S., et al, AIDS, 7 (suppl 2):S11-S 14, (1993), reporteros de ARN amplificables, replicación Q-beta, amplificación basada en transcripción, amplificación de ADN de bumerán, activación por desplazamiento de hebras, tecnología de sondas cíclicas, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico isotérmico (NASBA). Véase el documento de Kievits, T. et al, J Virological Methods, 35:273-286, (1991), Invader Technology, u otros ensayos de replicación de secuencias o ensayos de amplificación de señales. Estos procedimientos de amplificación, cada uno descrito brevemente más adelante, son bien conocidos en la técnica.

- 25 Algunos procedimientos emplean la transcripción inversa de ARN a ADNc. Pueden utilizarse diversas transcriptasas inversas, incluyendo, pero no limitadas a MMLV RT, RNase H mutantes de MMLV RT tales como Superscript y Superscript II (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.), AMV RT, y transcriptasa inversa termoestable de Thermus Thermophilus. Por ejemplo, un procedimiento, pero no el único procedimiento, que puede utilizarse para convertir el ARN extraído del plasma o suero en ADNc es el protocolo adaptado del sistema de preamplificación Superscript II (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.; nº de catálogo 18089-011), según lo descrito por Rashtchian, A., PCR Methods Applic, 4:S83-S91, (1994).

- En la técnica se conoce una diversidad de enzimas de amplificación, e incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa, RNA polimerasa, transcriptasa inversa, Q-beta replicasa, ADN termoestable y RNA polimerasas. Debido a que estas y otras reacciones de amplificación son catalizadas por enzimas, en un ensayo de una sola etapa los reactivos liberadores de ácido nucleico y los reactivos de detección no deberían ser inhibidores potenciales de las enzimas de amplificación si la detección final ha de estar basada en la amplificación. Procedimientos de amplificación adecuados para su uso con los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, la amplificación por desplazamiento de hebra, la amplificación de círculos rodantes, la preamplificación de extensión de cebador o la PCR de oligonucleótidos degenerados (DOP).

- En una realización, se utiliza PCR para amplificar una secuencia diana o marcadora de interés. El experto en la materia es capaz de diseñar y preparar cebadores que sean apropiados para amplificar una secuencia diana. La longitud de los cebadores de amplificación depende de varios factores, incluyendo la identidad de la secuencia de nucleótidos y la temperatura a la que estos ácidos nucleicos son hibridados o utilizados durante la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos. Las consideraciones necesarias para determinar una longitud preferida para un cebador de amplificación de una identidad de secuencia particular son bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, la longitud de un ácido nucleico u oligonucleótido corto puede relacionarse con su especificidad o selectividad de hibridación.

- 50 Para analizar SNPs y otras variantes de ácidos nucleicos, puede ser apropiado utilizar oligonucleótidos específicos para alelos alternativos. Estos oligonucleótidos que detectan variaciones de un único nucleótido en secuencias diana pueden denominarse con términos como "sondas específicas de alelo" o "cebadores específicos de alelo". El diseño y uso de sondas específicas de alelo para analizar polimorfismos se describe, por ejemplo, en el documento Mutation Detection A Practical Approach, Ed. Cotton et al. Oxford University Press, 1998; Saiki et al, Nature, 324: 163-166 (1986); Dattagupta, EP235,726; y Saiki, WO 89/11548. En una realización, una sonda o cebador puede estar diseñado para hibridar con un segmento de ADN diana de manera que el SNP se alinee con el extremo más 5' o el extremo más 3' de la sonda o el cebador.

- En algunas realizaciones, la amplificación puede incluir un cebador etiquetado, permitiendo así la detección del producto de amplificación de ese cebador. En realizaciones particulares, la amplificación puede incluir una multiplicidad de cebadores etiquetados; normalmente, tales cebadores son etiquetados de manera distinguible, permitiendo la detección simultánea de múltiples productos de amplificación.

En un tipo de ensayo basado en PCR, un cebador específico de alelo se hibrida a una región en una molécula de ácido nucleico diana que se superpone a una posición de SNP y sólo ceba la amplificación de una forma alélica a la que el cebador exhibe una complementariedad perfecta (Gibbs, 1989, *Nucleic Acid Res.*, 17:2427-2448). Típicamente, el nucleótido más 3' del cebador está alineado y es complementario a la posición de SNP de la molécula de ácido nucleico diana. Este cebador se utiliza junto con un segundo cebador que se hibrida en un sitio distal. La amplificación procede de los dos cebadores, produciendo un producto detectable que indica qué forma alélica está presente en la muestra de ensayo. Habitualmente se realiza un control con un segundo par de cebadores, uno de los cuales muestra un desapareamiento de una sola base en el sitio polimórfico y el otro exhibe complementariedad perfecta con un sitio distal. El desapareamiento de una sola base impide la amplificación o reduce sustancialmente la eficiencia de la amplificación, de modo que o bien no se forma ningún producto detectable o bien se forma en cantidades menores o a un ritmo más lento. El procedimiento generalmente funciona de manera más efectiva cuando el desapareamiento se encuentra en la posición más 3' del oligonucleótido (es decir, la posición más cercana a 3' del oligonucleótido se alinea con la posición de SNP diana) porque esta posición es la más desestabilizadora para la elongación del cebador (véase, por ejemplo, el documento WO93/22456).

En una realización específica, un cebador contiene una secuencia sustancialmente complementaria a un segmento de una molécula de ácido nucleico que contiene SNP diana, excepto que el cebador tiene un nucleótido desapareado en una de las tres posiciones de nucleótidos en el extremo más 3' del cebador, de modo que el nucleótido desapareado no forma par de bases con un alelo en particular en el sitio SNP. En una realización, el nucleótido desapareado en el cebador es el segundo del último nucleótido en la posición más 3' del cebador. En otra realización, el nucleótido mal emparejado en el cebador es el nucleótido pasado en la posición más 3' del cebador.

En una realización, el cebador o sonda está etiquetado con un colorante reportero fluorogénico que emite una señal detectable. Mientras que un colorante reportero adecuado es un colorante fluorescente, cualquier colorante reportero que se pueda unir a un reactivo de detección como una sonda o cebador de oligonucleótido es adecuado para su uso en la invención. Tales colorantes incluyen, pero no se limitan a acridina, AMCA, BODIPY, azul cascada, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, dabacilo, Edans, eosina, eritrosina, fluoresceína, 6-Fam, Tet, Joe, Hex, verde de Oregon, rodamina, verde de rodol, Tamra, Rox, y rojo de Texas.

Se apreciará que la descripción se extiende a reactivos que no contienen (o que son complementarios a) un nucleótido de SNP identificado en el presente documento, pero que se utilizan para ensayar uno o más SNP descritos en el presente documento. Por ejemplo, los cebadores que flanquean, pero no hibridan directamente a una posición de SNP diana proporcionada en el presente documento, son útiles en reacciones de extensión de cebador en las que los cebadores hibridan a una región adyacente a la posición de SNP diana (es decir, dentro de uno o más nucleótidos del sitio de SNP diana). Durante la reacción de extensión del cebador, un cebador normalmente no es capaz de extenderse más allá de un sitio de SNP diana si un nucleótido particular (alelo) está presente en ese sitio de SNP diana, y el producto de extensión del cebador puede ser detectado fácilmente para determinar qué alelo de SNP está presente en el sitio de SNP diana. Por ejemplo, normalmente se utilizan ddNTPs particulares en la reacción de extensión del cebador para terminar la extensión del cebador una vez que un ddNTP se incorpora al producto de extensión. Por lo tanto, los reactivos que se unen a una molécula de ácido nucleico en una región adyacente a un sitio de SNP, aunque las secuencias unidas no necesariamente incluyan el sitio de SNP en sí, también están englobados por la descripción.

Los ácidos nucleicos variantes pueden ser amplificados antes de la detección o pueden ser detectados directamente durante una etapa de amplificación (es decir, procedimientos en "tiempo real"). En algunas realizaciones, la secuencia diana es amplificada y el amplicón resultante se detecta por electroforesis. En algunas realizaciones, la mutación o variante específica se detecta secuenciando el ácido nucleico amplificado. En algunas realizaciones, la secuencia diana es amplificada utilizando un cebador etiquetado de modo que el amplicón resultante es etiquetado de manera detectable. En algunas realizaciones, el cebador es etiquetado fluorescentemente.

En una realización, la detección de una variante del ácido nucleico, como un SNP, se realiza utilizando el ensayo TaqMan®, que también se conoce como ensayo de nucleasa 5' (patentes de EE.UU. Nos. 5.210.015 y 5.538.848) o sonda de baliza molecular (patentes de EE.UU. Nos. 5.118.801 y 5.312.728), u otra sonda sin tallo o de baliza lineal (Livak et al, 1995, *PCR Method Appl.*, 4:357-362; Tyagi et al, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:303-308; Nazarenko et al, 1997, *Nucl. Acids Res.*, 25:2516-2521; patentes de EE.UU. Nos. 5.866.336 y 6.117.635). El ensayo TaqMan® detecta la acumulación de un producto amplificado específico durante la PCR. El ensayo TaqMan® utiliza una sonda oligonucleotídica etiquetada con un colorante reportero fluorescente y un colorante inhibidor de la fluorescencia. El colorante reportero es excitado por la irradiación a una longitud de onda apropiada, transfiere energía al colorante inhibidor de la fluorescencia en la misma sonda a través de un proceso llamado transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Cuando se une a la sonda, el colorante reportero excitado no emite ninguna señal. La proximidad del colorante inhibidor de la fluorescencia al colorante reportero en la sonda intacta mantiene una fluorescencia reducida para el reportero. El colorante reportero y el colorante inhibidor de la fluorescencia pueden

estar en los extremos más 5' y más 3', respectivamente, o viceversa. Alternativamente, el colorante reportero puede estar en el extremo más 5' o más 3' mientras que el colorante inhibidor de la fluorescencia está unido a un nucleótido interno, o viceversa. En otra realización más, tanto el reportero como el inhibidor de la fluorescencia pueden estar unidos a nucleótidos internos a una distancia unos de otros tal que se reduce la fluorescencia del reportero.

5

Durante la PCR, la actividad de la nucleasa 5' de la ADN polimerasa divide la sonda, separando de ese modo el colorante reportero y el colorante inhibidor de la fluorescencia y resultando en un aumento de la fluorescencia del reportero. La acumulación del producto de PCR se detecta directamente monitorizando el aumento de la fluorescencia del colorante reportero. La ADN polimerasa divide la sonda entre el colorante reportero y el colorante inhibidor de la fluorescencia sólo si la sonda se hibrida con la plantilla que contiene SNP diana que se amplifica durante la PCR, y la sonda está diseñada para hibridarse con el sitio de SNP diana sólo si está presente un alelo SNP en particular.

10

Las secuencias de cebador y sonda TaqMan® pueden determinarse fácilmente utilizando la variante e información de secuencia de ácidos nucleicos asociados proporcionada en el presente documento. Pueden utilizarse varios programas informáticos, como Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, California), para obtener rápidamente conjuntos óptimos de cebador/sonda. Resultará evidente para un experto en la materia que tales cebadores y sondas para detectar las variaciones genéticas de la descripción son útiles en el diagnóstico de trastornos de dolor paroxístico, y pueden ser incorporados fácilmente en un formato de kit.

15

La descripción también incluye modificaciones del ensayo TaqMan® bien conocidas en la técnica, como el uso de sondas de baliza molecular (patente de EE.UU. Nos. 5.118.801 y 5.312.728) y otros formatos de variante (patentes de EE.UU. Nos. 5.866.336 y 6.117.635).

20

Pueden utilizarse otros procedimientos de hibridación de sondas detectados en tiempo real para detectar la amplificación de una secuencia diana o marcadora que flanquea una región de repetición en tándem. Por ejemplo, pueden utilizarse las sondas MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences) disponibles comercialmente, que no están basadas en una degradación de la sonda. Las sondas MGB Eclipse™ funcionan mediante un mecanismo de fluorescencia activado por hibridación. Las sondas MGB Eclipse™ tienen el inhibidor de la fluorescencia oscuro Eclipse™ y el MGB situado en el extremo 5' de la sonda. El fluoróforo está ubicado en el extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda está en solución y no hibridada, la conformación tridimensional acerca el inhibidor de la fluorescencia al fluoróforo, y la fluorescencia se inhibe. Sin embargo, cuando la sonda se hibrida con una secuencia diana o marcadora, se despliega la sonda, el inhibidor de la fluorescencia se mueve del fluoróforo y puede detectarse la fluorescencia resultante.

25

30

Pueden diseñarse sondas de oligonucleótidos que tienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud y se hibridan con la región amplificada. Las sondas de oligonucleótidos son preferentemente de 12 a 70 nucleótidos; más preferentemente de 15 a 60 nucleótidos de longitud; y lo más preferentemente de 15 a 25 nucleótidos de longitud. La sonda puede estar etiquetada. Los fragmentos amplificados pueden detectarse utilizando procedimientos de electroforesis en gel estándar. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, las fracciones amplificadas son separadas en un gel de agarosa y teñidas con bromuro de etidio por procedimientos conocidos en la técnica para detectar fragmentos amplificados.

35

40

Otra metodología de detección adecuada implica el diseño y uso de combinaciones bipartitas de cebador/sonda, como las sondas Scorpion™. Estas sondas realizan el cebado específico de la secuencia y la detección del producto de PCR se logra utilizando una sola molécula. Las sondas Scorpion™ comprenden un cebador 3' con una cola de sonda extendida 5' que comprende una estructura de horquilla que posee un par fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia. La cola de la sonda está "protegida" de la replicación en la dirección de 5' a 3' por la inclusión de glicol de hexetileno (HEG) que bloquea a la polimerasa de replicar la sonda. El fluoróforo se une al extremo 5' y la fluorescencia se inhibe mediante una fracción acoplada al extremo 3'. Después de la extensión del cebador Scorpion™, la secuencia de sonda específica es capaz de unirse a su complemento dentro del amplicón extendido, abriendo así el bucle de la horquilla. Esto impide que la fluorescencia se inhiba y se observa una señal. Una diana específica es amplificada por el cebador inverso y la porción de cebador del Scorpion™, resultando en un producto de extensión. Se genera una señal fluorescente debido a la separación del fluoróforo del inhibidor de la fluorescencia que resulta de la unión del elemento de sonda del Scorpion™ al producto de extensión. Estas sondas se describen en el documento de Whitcombe et al, Nature Biotech 17: 804-807 (1999). Determinación del pronóstico

45

50

55

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un kit para el diagnóstico de un trastorno de dolor paroxístico que comprende instrucciones para utilizar dicho kit según los procedimientos definidos en el presente documento.

Los kits pueden ser preparados para la práctica de los procedimientos descritos en el presente documento. Normalmente, los kits incluyen al menos un componente o una combinación empaquetada de componentes útiles para la práctica del procedimiento de la invención. Los kits pueden incluir algunos o todos los componentes necesarios para

60

la práctica del procedimiento de la invención. Normalmente, los kits incluyen al menos una sonda específica para la una o más regiones definidas en el presente documento en al menos un contenedor. Estos componentes pueden incluir, entre otros, sondas de ácidos nucleicos, cebadores de ácidos nucleicos para amplificación de la una o más regiones definidas en el presente documento, tampones, instrucciones de uso y similares.

5

Se apreciará que una vez que un individuo ha sido identificado como propenso a sufrir o que sufre un trastorno de dolor paroxístico, entonces a dicho individuo se le prescribirá el tratamiento adecuado, como un bloqueador del canal de sodio Nav1.7.

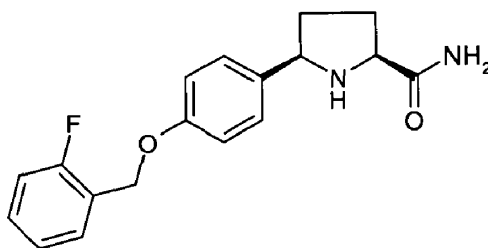
10 Así, según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para tratar un trastorno de dolor paroxístico en un sujeto humano donde dicho procedimiento comprende:

(a) detectar la presencia de una o más variaciones genéticas en el gen *CACNA1A* y/o en el gen *CACNA1B* de dicho sujeto; y

15 (b) administrar un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 a dicho paciente identificado como poseedor de dichas una o más variaciones genéticas.

En los documentos WO 2007/042239, WO 2007/042250, WO 2007/042240, WO 2013/179049, WO 2013/093497, WO 2013/093496, WO 2013/175206 y WO 2013/175205 se describen ejemplos de bloqueadores del canal de sodio Nav1.7 adecuados. En una realización, el bloqueador del canal de sodio Nav1.7 se selecciona de un compuesto descrito en el documento WO 2007/042250. En una realización adicional, el bloqueador del canal de sodio Nav1.7 se selecciona de un compuesto descrito en el documento WO 2007/042239. En otra realización adicional, el bloqueador del canal de sodio Nav1.7 es (5R)-5-(4-((2-fluorofenil)metil]oxi]fenil)-L-prolinamida o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo como se muestra en fórmula (I):

25



(I)

En otra realización adicional, el bloqueador del canal de sodio Nav1.7 es un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 estado-dependiente selectivo, como sal de clorhidrato de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida (CNV1014802).

Como se discutió anteriormente en el presente documento, el tratamiento actual para los trastornos de dolor paroxístico está asociado con una tolerabilidad deficiente y resulta en un control del dolor subóptimo. Por lo tanto, existe una gran necesidad de identificar a los individuos con mayor probabilidad de responder a tal terapia.

35

Así, según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para predecir si un paciente responderá al tratamiento con un bloqueador del canal de sodio Nav1.7, donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

40 (a) obtener una muestra biológica de un paciente; y

(b) detectar la presencia de una o más variaciones genéticas en el gen *CACNA 1A* y/o en el gen *CACNA1B* de dicho sujeto;

de modo que la presencia de dichas una o más variaciones genéticas es indicativa de que un paciente responderá al tratamiento con un bloqueador del canal de sodio Nav1.7.

45

En el estudio del presente documento se muestran datos de que todos los pacientes con variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o del gen *CACNA1B* respondieron sorprendentemente al tratamiento con un bloqueador del canal de sodio Nav1.7, como el CNV1014802.

50

Se apreciará que, una vez que se haya identificado un "respondedor", al paciente se le administrará adecuadamente un bloqueador del canal de sodio Nav1.7.

Así, en una realización, el procedimiento comprende además:

- (c) administrar un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 a dicho paciente identificado como poseedor de una o más variaciones genéticas.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 para su uso en el tratamiento de un trastorno de dolor paroxístico en un paciente, caracterizado porque dicho paciente ha sido seleccionado por poseer una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o del gen *CACNA1B*.

- Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno de dolor paroxístico en un paciente donde dicho procedimiento comprende las etapas de seleccionar un paciente que posee una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o del gen *CACNA1B* seguido por administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 a dicho paciente.

- Los siguientes estudios ilustran la invención.

Ejemplo 1: Ensayo de 7 semanas con pacientes con neuralgia del trigémino (NTG) identificando los respondedores a la terapia con CNV1014802

- El CNV1014802 es un bloqueador del canal de sodio selectivo estado-dependiente Nav1.7 novedoso que se está evaluando en el tratamiento de la neuralgia del trigémino. El ensayo utilizó un diseño de retiro aleatorio para evaluar la eficacia en esta rara afección y comprendió una fase abierta de 21 días seguida de una fase aleatoria controlada con placebo de 28 días para los respondedores, como se describe en los ensayos de Zakrzewska et al., (2013) 14:402).

- Los pacientes participaron en un período de tratamiento abierto inicial de 21 días de CNV1014802 usando 150 mg tres veces al día. Luego se asignó al azar a los respondedores a 28 días de CNV1014802 150 mg tres veces al día o placebo. Un respondedor al final del período abierto se definió como un paciente con uno de lo siguiente:

- 1) una disminución del 30 % o más en el número total de paroxismos durante los últimos 7 días de la fase abierta en comparación con el número total registrado en la fase de referencia de 7 días (día -7 a -1 antes del inicio de la medicación en estudio, preinclusión); y/o
- 2) una reducción del 30 % en la severidad media del dolor experimentado durante el paroxismo en los últimos 7 días de la fase abierta en comparación con el número total registrado en la fase de referencia de 7 días (día -7 a -1 antes del inicio de la medicación de estudio, preinclusión); y/o
- 3) una calificación de Mejora Global de Cambio del Paciente de mucho mejor/muchísimo mejor.

- Los encuestados fueron asignados al azar a CNV1014802 o placebo, en una proporción de 1:1. Durante la fase aleatoria doble ciego, los pacientes fueron evaluados en cada visita a la clínica, la cual se produjo cada 7 días para determinar si cumplían con los criterios de fracaso en el período de tratamiento doble ciego.

Los pacientes se clasificaron como fracaso del tratamiento si cumplían uno de los siguientes criterios:

- 1) un aumento del 50 % en la frecuencia de los paroxismos en comparación con los últimos 7 días del período abierto; y/o
- 2) un aumento del 50 % en la severidad del dolor experimentado en los paroxismos en comparación con los últimos 7 días del período abierto; y/o
- 3) una calificación de Mejora Global de Cambio del Paciente de mucho peor/muchísimo peor; y/o

- 4) el paciente interrumpe el estudio debido a "falta de eficacia"; y/o

- 5) el paciente interrumpe debido a una reacción adversa o a una baja tolerabilidad que se considera que está relacionada con el medicamento en estudio.

- Los datos para la frecuencia de los paroxismos y de la severidad del dolor se tomaron de los diarios diarios completados por los pacientes desde el periodo de preinclusión de 7 días hasta el final del periodo doble ciego (semana 7). Cuando los pacientes cumplieron con los criterios de fracaso del tratamiento, abandonaron el estudio y volvieron a su medicación anterior. El número promedio de paroxismos y la severidad del dolor recogidos en la última semana de

doble ciego (semana 7) se compararon con el período de 7 días de preinclusión utilizando una prueba T (igual varianza asumida, no emparejada). La última observación realizada (LOCF) se utilizó para los pacientes que cumplen con los criterios de fracaso del tratamiento antes del final del período de doble ciego (semana 7). Los resultados del estudio se muestran en la figura 1, donde puede verse que la reducción en el número de paroxismos y la severidad del dolor fue superior en el grupo con CNV1014802 en comparación con el grupo con placebo ($p=0,08$ y $p=0,04$, respectivamente).

Ejemplo 2: Análisis de genotipos de pacientes con neuralgia del trigémino (NTG)

- 10 Se secuenciaron dos genes del canal de calcio (Cav2.2 y Cav2.1) en muestras de sangre tomadas de pacientes con neuralgia del trigémino (TGN) indicados en el estudio descrito en el Ejemplo 1 como respondedores con el fin de explorar si en la TGN están presentes mutaciones raras (en menos del 10 % de la población general) en estos genes.

Canal	Gen diana	Coordenadas
Cav2.1	CACNA1A	GRCh37 (hg 19) NM_023035.2
Cav2.2	CACNA1B	GRCh37 (hg 19) NM_000718.3

- 15 El análisis se realizó utilizando la secuenciación de próxima generación utilizando un panel de enriquecimiento Agilent Haloplex personalizado y el instrumento Illumina MiSeq para secuenciar las regiones exónicas de los genes diana candidatos. El ADN genómico se aisló a partir de muestras de sangre entera utilizando un kit de purificación basado en columna de ADN de Qiagen. Se realizaron controles de calidad y cuantificación antes de la PCR para garantizar un ADN de alta calidad. El análisis bioinformático de los datos de secuenciación y la detección de mutaciones en genes diana se realizó utilizando GATK.

La incidencia de mutaciones se evaluó en una población coincidente utilizando la base de datos 1000G.

- 25 Se recogieron 37 muestras de pacientes con TGN y los resultados se muestran en la Tabla 1 y pueden resumirse de la siguiente manera:

- Se identificaron 10 variantes no sinónimas (codificantes) de CACNA1A (subunidad alfa del canal de calcio tipo P/Q) en todos los pacientes: 4 raros (= en menos del 10 % de la población general) y 6 novedosos. El 86 % de los pacientes con TGN tenían una mutación P/Q rara o novedosa y el 32 % tenía más de una. Una mutación novedosa (la mutación de sustitución y delección en el pb 13.318.707 de CACNA1A) que resulta en una delección de 2 aminoácidos en el C-terminal del canal P/Q se encuentra en el 62 % de los pacientes con TGN.

- 35 Se identificaron 5 variantes no sinónimas (codificantes) de CACNA1B (subunidad alfa del canal de calcio tipo N) en todos los pacientes: 4 raros (= en menos del 10 % de la población general) y 1 novedoso. El 24 % de los pacientes con TGN tenían una mutación de N rara o novedosa. El 41 % de los pacientes con TGN tenían más de 1 mutación de N y/o P/Q. Las variantes fueron delección o cambio de sentido, homo o heterocigoto.

- 40 Los resultados de este estudio han identificado un conjunto de mutaciones presentes en respondedores a la terapia de TGN que no se encuentran en pacientes normales. Estas mutaciones serán de utilidad no sólo en el diagnóstico de la TGN sino para identificar a pacientes que es probable que respondan al tratamiento con un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 como el CNV1014802.

Tabla 1: Resultados de genotipado de CACNA1A y CACNA1B

Cromosoma	Posición nucleótido	ID de mutación del	Frecuencia de 1000G	Gen	Tipo de mutación	Cambio de nucleótidos	Cambio de aminoácidos
chr9	140772434	rs187204220	0,062	CACNA1B	CAMBIO SENTIDO	Ggc/Agc	G17S
chr9	140772440	.	novedoso	CACNA1B	CAMBIO SENTIDO	Gag/Aag	E19K
chr9	140772477	rs201253748	<0,001	CACNA1B	CAMBIO SENTIDO	gGc/gTc	G31V
chr9	140777306	rs4422842	<0,001	CACNA1B	CAMBIO SENTIDO	aaC/aaG	N167K
chr9	140918181	rs11137342	<0,001	CACNA1B	CAMBIO SENTIDO	Acc/Gcc	T996A
chr19	13318671	.	novedoso	CACNA1A	DELECIÓN	cagcagcagcagcagcaggcg 1)/ccg	QQQQQQQA/(SEQ ID NO: 212320P
chr19	13318672	.	novedoso	CACNA1A	DELECIÓN	ccgcagcag/ccg	PQQ2312P
chr19	13318707	.	novedoso	CACNA1A	DELECIÓN	cccgcagcag/caa	PAA2316P
chr19	13318709	.	novedoso	CACNA1A	CAMBIO DEL MARCO DE LECTURA	CTGCG/C	-2312
chr19	13318811	rs147221323	0,02	CACNA1A	CAMBIO SENTIDO	Gcg/Acg	A2284T
chr19	13319891	.	novedoso	CACNA1A	INSERCIÓN	cat/catCAC	H2219HH
chr19	13319712	.	novedoso	CACNA1A	INSERCIÓN	cac/caCCCC	H2212HP
chr19	13397560	rs16027	0,07	CACNA1A	CAMBIO SENTIDO	Ggc/Agc	G1104S
chr19	13409407	rs16024	<0,01	CACNA1A	CAMBIO SENTIDO	Gag/Aag	E1014K
chr19	13411451	rs16019	0,01	CACNA1A	CAMBIO SENTIDO	gAa/gCa	E731A

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Convergence Pharmaceuticals Limited

5 <120> PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO

<130> CON-C-P1735PCT

<150> GB1409851.1

10

<151> 03/06/2014

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

20

<212> ADN

<213> Humano

25 <400> 1

cagcagcagc agcagcaggc g

21

<210> 2

30

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Humano

<400> 2

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala

1

5

REIVINDICACIONES

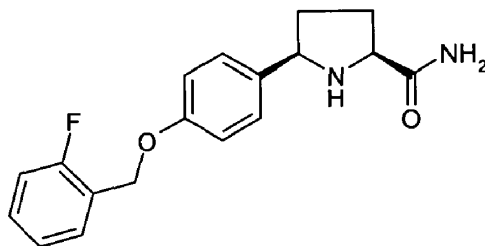
1. Un procedimiento de diagnóstico de la neuralgia del trigémino en un sujeto humano donde dicho procedimiento comprende detectar la presencia de una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o del gen *CACNA1B* de dicho sujeto.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde las variaciones genéticas incluyen: mutaciones (por ejemplo, mutaciones puntuales), inserciones, sustituciones, deleciones, cambios del marco de lectura, polimorfismos de nucleótido único (SNP), haplotipos, anomalías cromosómicas, variación del número de copias (CNV), epigenética e inversiones en ADN.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, donde las variaciones genéticas se seleccionan de entre sustituciones, inserciones, deleciones y cambios del marco de lectura.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las variaciones genéticas se detectan dentro del gen *CACNA1A* y las variaciones genéticas están entre el pb 13.300.000 y el pb 13.450.000 en el cromosoma 19.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, donde las variaciones genéticas se seleccionan de entre una o más de:
 - (a) una mutación de sustitución y deleción en el pb 13.318.671;
 - (b) una mutación de sustitución y deleción en el pb 13.318.672;
 - (c) una mutación de sustitución y deleción en el pb 13.318.707;
 - (d) una mutación del marco de lectura en el pb 13.318.709;
 - (e) una mutación de sustitución en el pb 13.318.811;
 - (f) una mutación de inserción en el pb 13.319.691;
 - (g) una mutación de inserción en el pb 13.319.712;
 - (h) una mutación de sustitución en el pb 13.397.560;
 - (i) una mutación de sustitución en el pb 13.409.407, y
 - (j) una mutación de sustitución en el pb 13.411.451.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, donde las variaciones genéticas se seleccionan de entre una o más de:
 - (a) una mutación de sustitución y deleción en el pb 13.318.671;
 - (b) una mutación de sustitución y deleción en el pb 13.318.672;
 - (c) una mutación de sustitución y deleción en el pb 13.318.707;
 - (d) una mutación del marco de lectura en el pb 13.318.709;
 - (f) una mutación de inserción en el pb 13.319.691; y
 - (g) una mutación de inserción en el pb 13.319.712.
7. El procedimiento según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, donde las variaciones genéticas se seleccionan de:
 - (b) una mutación de sustitución y deleción en el pb 13.318.672.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las variaciones genéticas se detectan dentro del gen *CACNA1B* y las variaciones genéticas están entre el pb 140.750.000 y el pb 140.950.000 en el cromosoma 9.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, donde las variaciones genéticas se seleccionan de entre una o más de:
 - (a) una mutación de sustitución en el pb 140.772.434;
 - (b) una mutación de sustitución en el pb 140.772.440;
 - (c) una mutación de sustitución en el pb 140.772.477;
 - (d) una mutación de sustitución en el pb 140.777.306, y
 - (e) una mutación de sustitución en el pb 140.918.181.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, de donde las variaciones genéticas se seleccionan de:
 - (b) una mutación de sustitución en el pb 140.772.440.

11. Un bloqueador del canal de sodio Nav1.7 para el tratamiento de la neuralgia del trigémino en un paciente, **caracterizado porque** en dicho paciente se han detectado una o más variaciones genéticas dentro del gen *CACNA1A* y/o del gen *CACNA1B*.

5

12. El bloqueador del canal de sodio Nav1.7 para uso según la reivindicación 11, donde el bloqueador del canal de sodio Nav1.7 es un bloqueador del canal de sodio estado-dependiente selectivo Nav1.7.

13. El bloqueador del canal de sodio Nav1.7 para uso según la reivindicación 11 o 12, donde el bloqueador
10 del canal de sodio Nav1.7 es (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable como se muestra en la fórmula (I):



(I).

15 14. El bloqueador del canal de sodio Nav1.7 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el bloqueador del canal de sodio Nav1.7 es la sal de clorhidrato de (5R)-5-(4-[[[(2-fluorofenil)metil]oxi]fenil]-L-prolinamida (CNV1014802).

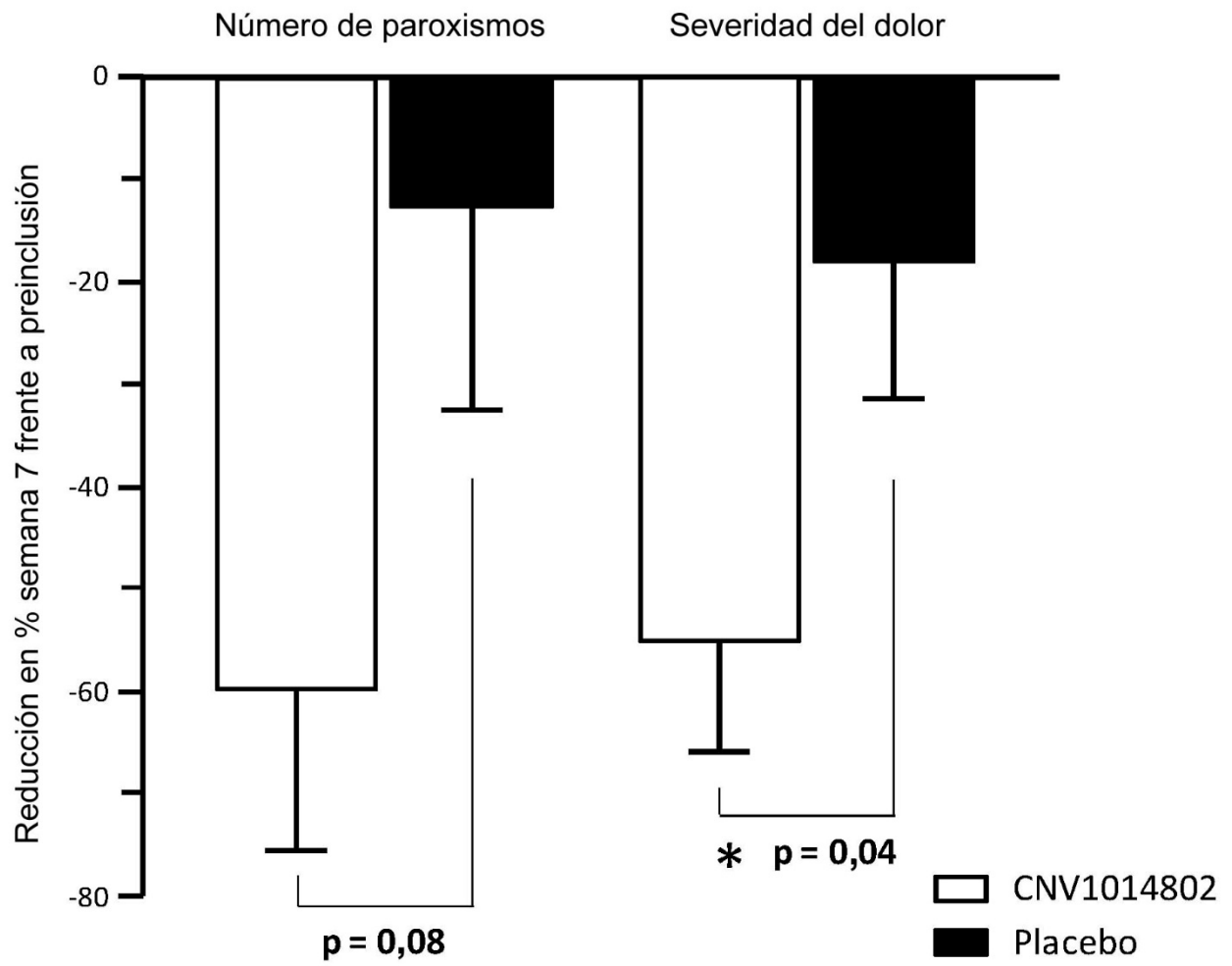


FIGURA 1