

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 364 210**

21 Número de solicitud: 201030214

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **16.02.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2011**

Fecha de la concesión: **02.03.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **14.03.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
CAMPUS UNIVERSITARIO
AVDA. DE ELVAS, S/N
06071 BADAJOZ, ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA-AGÚNDEZ PÉREZ-COCA, JOSÉ AUGUSTO y
GARCÍA MARTÍN, MARÍA ELENA**

74 Agente/Representante:

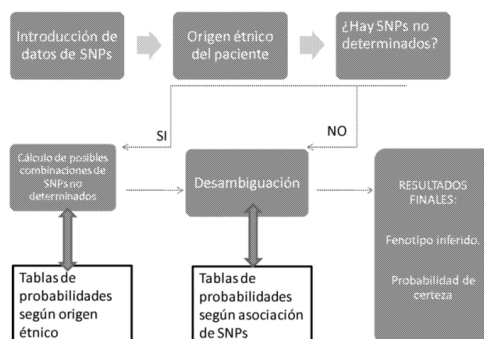
Carpintero López, Mario

54 Título: **MÉTODO PARA LA DESAMBIGUACIÓN DEL METABOLISMO ACETILANTE DE UN INDIVIDUO.**

57 Resumen:

La presente invención se encuadra en el campo de la medicina personalizada. En particular, la presente invención se refiere a un método para la desambiguación del metabolismo acetilante del gen NAT2 de un individuo. Este método es de utilidad para la predicción del metabolismo de fármacos por parte de un individuo concreto con la finalidad de minimizar los riesgos de posibles efectos secundarios provocados por un determinado fármaco.

Fig. 1



ES 2 364 210 B2

DESCRIPCIÓN

Método para la desambiguación del metabolismo acetilante de un individuo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en el campo de la medicina personalizada. En particular, la presente invención se refiere a un método para la desambiguación del metabolismo acetilante del gen NAT2 de un individuo. Este método es de utilidad para la predicción del metabolismo de fármacos por parte de un individuo concreto con la finalidad de minimizar los riesgos de posibles efectos secundarios provocados por un determinado fármaco.

Antecedentes de la invención

El metabolismo de los fármacos comprende un conjunto de reacciones bioquímicas que resultan en modificaciones de su estructura. Estas modificaciones pueden producir metabolitos inactivos, metabolitos activos o productos metabólicos con actividad farmacológica distinta a la del fármaco original. En la fase I del metabolismo de los fármacos, suelen darse oxidaciones, reducciones o hidrólisis. Estas reacciones suelen introducir en la estructura del fármaco un grupo reactivo que lo convierte en más activo químicamente. En la Fase II, suelen darse reacciones de conjugación, que por regla general, inactivan el fármaco y favorecen su eliminación renal o biliar. La mayoría, aunque no todas las reacciones de la fase 2 tienen lugar en el hígado. La enzima N-acetiltransferasa tipo 2 (NAT2), participa en la fase II o metabolismo hepático de los medicamentos. Según sus polimorfismos genéticos, y de acuerdo con su capacidad acetilante, los pacientes se clasifican en acetiladores lentos, medios o rápidos.

Entre los fármacos que se acetilan de forma polimórfica por la enzima NAT2 se encuentran fármacos antituberculosos como la isoniácida, o la rifampicina, así como metabolitos de otros fármacos como el metamazol o el clonacepam. Tradicionalmente la clasificación se hacía en base a ensayos fenotípicos llevados a cabo con sustratos como la cafeína o la isoniazida. Más recientemente, análisis en el gen que codifica la enzima NAT2, que se encuentra en el cromosoma 8p22 han permitido la identificación de varias decenas de alelos NAT2. Los individuos que son acetiladores rápidos, llevan uno o dos alelos que codifican para enzimas de alta actividad (NAT2*4 y NAT2*12) mientras que los acetiladores lentos tienen dos alelos de baja actividad. La actividad enzimática resultante de la combinación particular de alelos de cada individuo determina, no solo la concentración del fármaco, si no también su eficacia y su toxicidad. Así, la capacidad acetilante de los individuos condiciona mucho el espectro de antibióticos que toleran. Por ejemplo, en individuos sometidos a tratamientos contra la tuberculosis, los acetiladores lentos presentan una mayor probabilidad a desarrollar polineuropatías y hepatotoxicidad. De hecho, a dosis terapéuticas, existe una elevada asociación entre el genotipo NAT2 y el daño hepático severo, incluyendo el cáncer de hígado y vesícula. Por lo tanto, el genotipado de NAT2, previo a la terapia serviría para evitar daños adversos en los pacientes y para personalizar la dosis terapéutica más apropiada de este tipo de fármacos (*Ohno et al., 2000. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 4:256-261*). La determinación del genotipo NAT2 en la práctica clínica está dificultada por la existencia de combinaciones ambiguas de haplotipos que lleva a equivocaciones en la clasificación de los pacientes. Métodos para el genotipado de NAT2 en la práctica clínica van desde el análisis por amplificación-restricción, PCR, la secuenciación, a los microarrays. Sin embargo, estos métodos no pueden resolver el genotipo cuando existen varias posibles ordenaciones de mutaciones que conducen a diferentes fenotipos acetiladores. Como consecuencia los esfuerzos para evitar daños hepáticos irreversibles debido a la sobredosis en pacientes con fenotipo acetilante lento, no encuentran una solución efectiva. Para solucionar este problema se han diseñado diversas estrategias basadas en estadísticas para reconstruir los haplotipos NAT2 (*Stephens et al., 2001; Stephens and Donnelly 2003; Golka et al., Arch Toxicol 2008, 82:265-70*)

No obstante, estos métodos se basan exclusivamente en algoritmos matemáticos asumiendo que los diferentes haplotipos se asocian entre ellos de acuerdo con Leyes matemáticas de probabilidad. En la naturaleza esto no ocurre pues la presión evolutiva disminuye la esperanza de vida de los individuos portadores de aquellas combinaciones peor adaptadas, impidiendo en ocasiones incluso que lleguen a producir descendientes por lo que, en la naturaleza, la probabilidad de que una combinación determinada se de no obedece a leyes únicamente probabilísticas si no también biológicas.

Un estudio comparativo entre los resultados que predicen el método matemático y lo que ocurre en la naturaleza, demuestra que la determinación del genotipo NAT2 no puede ser resuelta claramente mediante técnicas de predicción matemáticas. En este estudio, un 0.8% de los individuos fueron clasificados erróneamente cuando se utilizaron únicamente los algoritmos matemáticos para la predicción (*Agundez et al., Clinical Chemistry 2008 54:8*). El método de desambiguación descrito en dicho estudio se basaba en el análisis de haplotipos para 7 polimorfismos comunes en el gen NAT2 (191, 282, 341, 481, 590, 803 y 857), sin embargo, tenía el problema de que estaba limitado a datos recogidos solo para la raza caucásica y por tanto solo es aplicable a la desambiguación del fenotipo acetilador en individuos de esta raza. Además este método no proporciona la indicación de la probabilidad de predicción correcta.

La presente invención proporciona un método para la desambiguación del fenotipo acetilador que no solo soluciona estos problemas sino que además tiene la ventaja de que se basa en el estudio de 4 polimorfismos en vez de 7 lo cual representa una disminución sustancial del trabajo analítico. El método, además, permite directamente inferir el fenotipo acetilador a partir de diplotipos en vez de haplotipos lo que evita el paso de tener que deconstruir los genotipos para luego reconstruirlos por predicción de haplotipos. Por último, el método de la presente invención es aplicable para la desambiguación del fenotipo acetilador de cualquier individuo independientemente de su raza.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: esta figura representa esquemáticamente los pasos del método para la desambiguación del fenotipo acetilador del gen NAT2 de la presente invención.

Descripción de la invención

La presente invención tiene por objeto un método para la desambiguación del fenotipo acetilante del gen NAT2 de un individuo que comprende las etapas de:

- (i) Determinación de al menos uno de los puntos polimórficos 191, 341, 590 y 857 del gen NAT2 de dicho individuo,
- (ii) Generación de un valor numérico de cuatro cifras, cada una de ellas correspondiente a cada uno de los puntos polimórficos determinados en (i), donde el número 0 implica que no existe ninguna mutación para dicho punto polimórfico, el número 1 implica que existe un alelo mutado y otro no mutado para dicho punto polimórfico, el número 2 implica que existen 2 alelos mutados para dicho punto polimórfico y el número 3 implica que no se determinó ese punto polimórfico de manera que:
 - a. Si se han determinado los 4 puntos polimórficos, se pasa a la etapa (iii).
 - b. Si no se han determinado los 4 puntos polimórficos se calculan las posibles combinaciones de puntos polimórficos no determinados en función de los factores de ponderación por origen étnico (obtención del factor de ponderación) según la siguiente tabla 1:

TABLA 1

Posición	Caucásicos	Orientales	Africanos
191	0 = 98.9% 1 = 1.1% 2 = 0%	0 = 100% 1 = 0% 2 = 0%	0 = 87.8% 1 = 11.8% 2 = 0.4%
341	0 = 30.4% 1 = 49.5% 2 = 20.2%	0 = 93.5% 1 = 6.4% 2 = 0.1%	0 = 33.9% 1 = 48.6% 2 = 17.5%
590	0 = 52.9% 1 = 39.6% 2 = 7.4%	0 = 55.6% 1 = 37.9% 2 = 6.5%	0 = 54.8% 1 = 38.5% 2 = 6.8%
857	0 = 96.3% 1 = 3.7% 2 = 0%	0 = 75.4% 1 = 22.9% 2 = 1.7%	0 = 95.2% 1 = 4.8% 2 = 0.1%

y se pasa a la etapa (iii).

- (iii) Inferencia la probabilidad del fenotipo concreto del individuo mediante la siguiente tabla de conversión de diplotipos en fenotipos:

TABLA 2

Diplotipo	RAPIDO	INTERMEDIO	LENTO
0000	100%	0%	0%
0001	0 %	100%	0%
0010	0%	100%	0%
0011	0%	0%	100%
0100	0%	100%	0%
0101	0%	0%	100%
0110	0%	0%	100%
0111	0%	0%	100%
1000	0%	100%	0%
1001	0%	0%	100%
1010	0%	20%	80%
1011	0%	0%	100%
1100	0%	40%	60%
1101	0%	0%	100%
1110	0%	0%	100%
1111	0%	0%	100%

- (iv) Aplicación de los factores de ponderación de origen étnico para cada diplotipo obtenidos en el paso (ii) en aquellos individuos en los que no se han determinado los cuatro puntos polimórficos para predecir la probabilidad de cada fenotipo.

La etapa (i) del método implica el análisis y determinación de al menos uno de los puntos polimórficos 191, 341, 590 y 857 del gen NAT2 del sujeto de estudio. Los polimorfismos presentes en estas posiciones del gen NAT2 consisten en las siguientes sustituciones de nucleótidos: 191 (rs1801279, CGG \Rightarrow CAG) que induce un cambio de aminoácido 64 R [Arg] \Rightarrow Q [Gln]; 341 (rs56935242, ATT \Rightarrow ACT) que induce un cambio de aminoácido 114 I [Ile] \Rightarrow T [Thr]; 590 (rs1799930, CGA \Rightarrow CAA) que induce un cambio de aminoácido 197 R [Arg] \Rightarrow Q [Gln]; y 857 (rs1799931, GGA \Rightarrow GAA) que induce un cambio de aminoácido 286 G [Gly] \Rightarrow E [Glu]. Cada uno de estos cambios de aminoácido induce una alteración en la enzima que se traduce en una marcada disminución de la actividad enzimática y por lo tanto en la capacidad de acetilar fármacos en los portadores de estas mutaciones.

La determinación de estos puntos polimórficos implica la identificación de la presencia o ausencia de estas mutaciones a partir de muestras biológicas del individuo objeto de análisis. Esta identificación se puede hacer por cualquier técnica común utilizada en biología molecular como por ejemplo por PCR o por secuenciación.

En una realización particular y preferida de la invención se lleva a cabo la determinación de los 4 puntos polimórficos.

La información obtenida acerca de cada punto polimórfico del gen NAT2 sirve para llevar a cabo el paso (ii). Este comprende la asignación de un código numérico a cada individuo analizado en base a la presencia o ausencia de mutaciones para cada uno de estos puntos polimórficos en cada uno de los alelos del gen NAT2 del individuo. El valor numérico del individuo, por tanto, representa el diplotipo del individuo para el gen NAT2.

La realización preferida de la invención comprende el análisis y determinación de los cuatro puntos polimórficos (191, 341, 590 y 857) del gen NAT2 pero en caso de que no se disponga de datos sobre alguno de ellos el método de la presente invención permite aún así la predicción del fenotipo acetilante del individuo mediante la aplicación de un factor de ponderación étnico. La aplicación de factor de ponderación étnico permitirá calcular la probabilidad de que en realidad ocurran cada uno de los diplotipos posibles, que será diferente dependiendo de la raza del individuo analizado. Este factor de ponderación se aplicará en el último paso del procedimiento para calcular la probabilidad real de que el individuo sea un acetilador rápido, lento o intermedio.

El factor de ponderación se aplica para cada uno de los puntos polimórficos no determinados según las probabilidades especificadas en la tabla 1. Los datos de esta tabla se obtuvieron del análisis de las frecuencias de cada una de las mutaciones en varios miles de muestras de DNA de individuos de distinto origen étnico. Para ello se purificó ADN genómico de cada individuo y se determinó la presencia de mutaciones por técnicas de amplificación alelo-específica.

En la práctica la asignación de los valores numéricos en el paso (ii) del método funcionaría de la siguiente forma:

A- Análisis del genotipo en la posición 191, con cuatro opciones: 0= no existen mutaciones; 1 = existe un alelo mutado y otro no mutado; 2 = existen dos alelos mutados; 3 = no se determinó esa mutación.

B- Análisis del genotipo en la posición 341, con cuatro opciones: 0= no existen mutaciones; 1 = existe un alelo mutado y otro no mutado; 2 = existen dos alelos mutados; 3 = no se determinó esa mutación.

C- Análisis del genotipo en la posición 590, con cuatro opciones: 0= no existen mutaciones; 1 = existe un alelo mutado y otro no mutado; 2 = existen dos alelos mutados; 3 = no se determinó esa mutación.

D- Análisis del genotipo en la posición 857, con cuatro opciones: 0= no existen mutaciones; 1 = existe un alelo mutado y otro no mutado; 2 = existen dos alelos mutados; 3 = no se determinó esa mutación.

Una vez que se ha asignado un valor numérico que defina el diplotipo del individuo, se infiere la probabilidad del fenotipo concreto del individuo aplicando la tabla 2 de conversión de diplotipos en fenotipos. Los datos obtenidos en la Tabla 2 son el resultado del análisis de varios miles de cromosomas realizados en el laboratorio de los inventores. Se purificaron muestras de DNA genómico y en cada individuo se determinó la presencia y el número de copias de cada una de las mutaciones por procedimientos de PCR alelo-específico y por amplificación-restricción. Se ha procedido también a secuenciar el ADN para elucidar casos que no eran concluyentes por los métodos anteriores.

En el caso de que no se hubieran determinado todos los puntos polimórficos habría que llevar a cabo el paso adicional de calcular la probabilidad combinada para cada diplotipo posible aplicando el factor de ponderación étnico descrito según la tabla 1.

Para entender como llevar a cabo el método pondremos el ejemplo de un paciente oriental al cual no se determinó la posición 857.

Tras el análisis de las otras tres posiciones se determina que este individuo tiene un genotipo 1103. En este caso primero habría que especificar cada uno de los diplotipos posibles, estos serían los siguientes 1100, 1101 y 1102. Teniendo en cuenta el origen étnico oriental del individuo y de acuerdo con la tabla de probabilidades según origen étnico (tabla 1) se obtendría que la probabilidad de que tenga un diplotipo 1100 es de un 75.4%, un 22.9% para el diplotipo 1101 y un 1.7% para el diplotipo 1102.

Ahora si observamos en la tabla de conversión de diplotipos en fenotipos se observa lo siguiente para cada uno de los posibles diplotipos

Diplotipo	Lento	Intermedio	Rápido
1100	60.0%	40.0%	0%
1101	100%	0%	0%
1102	100%	0%	0%

Al combinar los resultados de los diplotipos posibles y factor de ponderación, globalmente, la posibilidad de que el individuo con código 1103 tenga un fenotipo lento será $= (75.4 \times 60.0) + (22.9 \times 100) + (1.7 \times 100) = 69.8\%$. La probabilidad de que el fenotipo sea intermedio es $(75.4 \times 40.0) + (22.9 \times 0) + (1.7 \times 0) = 30.1\%$, y finalmente la probabilidad de que tenga un fenotipo rápido será $(75.4 \times 0) + (22.9 \times 0) + (1.7 \times 0) = 0\%$. Estos son los valores finales que se obtienen en este caso.

En otro aspecto la presente invención hace referencia a un programa informático que comprende medios de código de programa informático adaptados para realizar las etapas del método para la desambiguación del fenotipo acetilante de NAT2 de la presente invención cuando dicho programa se ejecuta en un ordenador, un procesador de señal digital, una disposición de puertas de campo programable, un circuito integrado de aplicación específica, un microprocesador, un microcontrolador, y cualquier otra forma de hardware programable.

Modo de realización de la invención

Los inventores recogieron datos biológicos relativos a las combinaciones de haplotipos NAT2 en base a polimorfismos genéticos conocidos (SNPs) y extrajeron de estos datos información relativa al peso específico de cada uno de estos SNPs en función de la raza del individuo. Dichos datos biológicos se recogieron sobre una población total de 4500 individuos dentro de la cual 2300 individuos eran de raza caucásica, 1100 individuos eran orientales y 1100 individuos eran de raza africana.

El análisis genético de los individuos se llevó a cabo mediante una serie de amplificaciones alelo-específicas sobre el ADN genómico de cada individuo que fue purificado por métodos estándar.

La amplificación alelo-específica se basó en dos niveles de amplificación. Primero se realizó una amplificación del gen completo y de regiones adyacentes 5' y 3', y posteriormente se realizó para cada mutación estudiada, un par de reacciones de amplificación utilizando oligonucleótidos específicos para secuencias mutadas y no mutadas.

La primera reacción amplificó un fragmento de 1213 pb, que incluía el exón codificador de NAT2. Los oligonucleótidos usados (N1: 5'-AATTAGTCACACGAGGA-3'-SEQ ID NO 1-, que abarca las posiciones -74 a -58 del gen y N2: 5'-TCTAGCATGAATCACTCTG-3'-SEQ ID NO 2-, que abarca las posiciones 1120 a 1138.), se situaban fuera de la región donde se producen habitualmente las mutaciones. Se trató por lo tanto de una reacción de amplificación no influenciada por las mutaciones del gen. La secuencia de los oligonucleótidos se escogió de aquellas zonas donde existían más diferencias de bases entre NAT2, y genes relacionados como NAT1 y NATP. De este modo se evitaron posibles amplificaciones inespecíficas.

Las amplificaciones específicas permitieron detectar mutaciones puntuales a lo largo del gen. Dado que cada individuo posee una pareja de genes, fueron necesarias dos reacciones independientes por cada posición analizada. Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron a partir de la secuencia de bases que abarca la posible mutación y adyacentes. Se diseñaron por lo tanto dos cebadores, uno para el alelo silvestre y otro para el alelo mutado de cada posición. La longitud de los nucleótidos venía definida por la temperatura de hibridación. Se buscó la más adecuada para utilizar cada oligonucleótido en combinación con el oligonucleótido N1.

Los oligonucleótidos usados en conjunción con N1 para la amplificación de cada posición tanto silvestre como mutada fueron los siguientes:

- *Posición 857*: Oligonucleótido 857G: 5'-AATAGTAAGGGATC-3' (SEQ ID NO 3) y 857A: 5'-AATAGTAAGG GATT-3' (SEQ ID NO 4).

- *Posición 590*: Oligonucleótido 590G: 5'-CAAAATCTTCAATTGTTC-3' (SEQ ID NO 5) y 590A: 5'-CAAAAT CTTCAATTGTTT-3' (SEQ ID NO 6).

- *Posición 341*: Oligonucleótido 341T: 5'-ATTCCTGCCGTCAA-3 (SEQ ID NO 7) y 341C: 5'-ATTCCTGCCGT CAG-3' (SEQ ID NO 8).

- *Posición 191*: Oligonucleótido 191G: 5'-ACCACCCACCCC-3' (SEQ ID NO 9) y 191A: 5'-ACCACCCACCCCT-3' (SEQ ID NO 10).

Las condiciones y reactivos de la reacción fueron:

- 1 μ l de DNA de la reacción N, es decir de la amplificación inicial del gen NAT2
- 50 nM de oligonucleótido N1
- 50 nM de oligonucleótido específico para cada mutación y 50 nM secuencia silvestre (en tubos diferentes)
- 100 μ M de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
- 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl y 0.1 mg/ml de gelatina
- 1.25 U de Taq polimerasa
- Agua MilliQ estéril hasta alcanzar un volumen de 25 μ l.

Las condiciones de amplificación para todas las reacciones fueron: 1 minuto a 94°C, después la reacción se situó a la temperatura de hibridación específica para cada reacción durante 1 minuto y finalmente a 72°C durante otro minuto. Cada par de reacciones tenía su temperatura de hibridación y número de ciclos diferentes, que se eligieron cuidadosamente para lograr un grado de discriminación máximo entre secuencias mutadas y no mutadas. Estas temperaturas y el número de ciclos fueron:

Mutación 857: 44°C y 18 ciclos

Mutación 590: 56°C y 15 ciclos

5 Mutación 341: 52°C y 17 ciclos

Mutación 191: 47°C y 18 ciclos

10 Mediante esta metodología desarrollada, cualquier producto PCR se pudo analizar posteriormente para identificar en él otras posibles mutaciones pudiéndose averiguar así las asociaciones de mutaciones en un mismo alelo (determinación de los haplotipos). Las reacciones específicas se realizaron en sentido 3'-5', es decir, la primera que se realizó fue la 857 y la última la 191. En el momento en que se detectó una discrepancia en la secuencia (heterozigosidad) en cualquier posición (y por lo tanto dos productos de PCR distintos, cada uno correspondiente a un alelo) el resto de mutaciones pudieron ser analizadas por separado en cada alelo.

20 Otro método alternativo para la detección de mutaciones puntuales en el gen NAT2 fue el de amplificación-restricción, y consistió en el uso de endonucleasas de restricción que cortaron el DNA en puntos específicos para cada enzima. La utilidad de este método se basa en que seis de las siete mutaciones puntuales descritas en el gen NAT2 modifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas. Los detalles se especifican en Agundez y Cois. Pharmacogenetics 1996; 6: 501-512.

25 De este modo la presencia de estos sitios de restricción indicaban secuencias no mutadas en la posición 191, 282, 481, 590 y 857, y secuencia mutada en la posición 803. Los fragmentos resultantes de la digestión se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa. Habitualmente el producto de la digestión enzimática fue suficiente para su visualización directa por tinción con bromuro de etidio. En casos en los que la cantidad de DNA digerido fue insuficiente para poder ser vistos directamente, se transfirió el DNA a un soporte sólido y se hibridó con una sonda complementaria marcada. Tras revelado se pudieron observar las bandas generadas, y deducir en función del tamaño si había habido digestión del DNA.

30 Integrando los datos biológicos obtenidos (datos no mostrados) en algoritmos de predicción matemática (el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 15.0 para Windows -SPSS Inc., Chicago, 111. USA-), se han desarrollado unas tablas que establecen la probabilidad de ocurrencia de un fenotipo concreto en función del diplotipo analizado y en función del origen étnico del individuo. Estas tablas son la base para el desarrollo de un método para la desambiguación del fenotipo NAT2 que permite la determinación inequívoca de la funcionalidad metabólica del individuo y que es aplicable a todas las razas humanas.

El desarrollo matemático es el siguiente:

40 Los resultados del análisis genético de cada punto polimórfico del individuo que se desea analizar se utilizan para obtener un código de 4 cifras de las cuales la primera es el valor en la posición 191, la segunda la posición 341, la tercera es la posición 590 y la cuarta es la posición 857. Por ejemplo, un paciente en el que se haya comprobado la existencia de una mutación en la posición 191, dos en la 341, ninguna en la 590 y no se haya determinado la 857 obtendría un código igual a 1203.

45 En caso de existir algún punto en el que no se haya determinado la mutación (un valor = a 3), se realizarán tres cálculos independientes en los que el valor "3" se sustituirá por cada diplotipo posible en la población del paciente y la probabilidad de certeza se modificará en función de los siguientes factores de corrección, que se han obtenido a partir del análisis de mutaciones en varios miles de pacientes de diverso origen étnico. La tabla 1 define la probabilidad del diplotipo para cada punto polimórfico según el origen étnico.

55

60

65

TABLA 1

Posición	Caucásicos	Orientales	Africanos
191	0 = 98.9% 1 = 1.1% 2 = 0%	0 = 100% 1 = 0% 2 = 0%	0 = 87.8% 1 = 11.8% 2 = 0.4%
341	0 = 30.4% 1 = 49.5% 2 = 20.2%	0 = 93.5% 1 = 6.4% 2 = 0.1%	0 = 33.9% 1 = 48.6% 2 = 17.5%
590	0 = 52.9% 1 = 39.6% 2 = 7.4%	0 = 55.6% 1 = 37.9% 2 = 6.5%	0 = 54.8% 1 = 38.5% 2 = 6.8%
857	0 = 96.3% 1 = 3.7% 2 = 0%	0 = 75.4% 1 = 22.9% 2 = 1.7%	0 = 95.2% 1 = 4.8% 2 = 0.1%

De este modo se calculan tres posibles combinaciones para la mutación que no se ha determinado y se almacena un valor de certeza para cada combinación (cada diplotipo).

Por ejemplo en el caso del paciente con un código inicial de 1103, si el paciente es de origen oriental existirían tres posible diplotipos para calcular:

1100, con una probabilidad del 75.4%

1101, con una probabilidad del 22.9%

1102, con una probabilidad del 1.7%

En casos más complejos, en los que faltan por determinar dos o más mutaciones, se aplican los mismos factores de corrección a todos las posibles combinaciones. Por ejemplo un paciente Caucásico con un código 3103 las combinaciones y los valores de certeza, obtenidos del multiplicar las probabilidades de cada combinación para los polimorfismos situados en las posiciones 1 y 4 serían:

0100, probabilidad (98.9% y 96.3%) = 95.2%

1100, probabilidad (1.1% y 96.3%) = 1.1%

2100, probabilidad (0% y 96.3%) = 0%

0101, probabilidad (98.9% y 3.7%) = 3.7%

1101, probabilidad (1.1% y 3.7%) = 0%

2101, probabilidad (0% y 3.7%) = 0%

0102, probabilidad (98.9% y 0%) = 0%

1102, probabilidad (1.1% y 0%) = 0%

2102, probabilidad (0% y 0%) = 0%

A continuación se analiza la presencia de valores en los diplotipos que sean iguales a 2 (equivalente a dos alelos mutados). Estos diplotipos, clasificados como no ambiguos, pasan directamente a la clasificación de acetiladores

lentos con un porcentaje de certeza del 100% y finaliza el análisis. La base de esta clasificación está en la referencia Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. Agúndez JA, Golka K, Martínez C, Selinski S, Blaszkewicz M, García-Martín E. Clin Chem. 2008 Aug; 54 (8):1390-4.

- 5 El siguiente paso del proceso, en el que entran directamente los casos en que se hayan determinado las cuatro mutaciones, es aplicar la predicción de fenotipos, consultando en la Tabla 2 el diplotipo (columna 1) y los correspondientes resultados en las tres últimas columnas.

	Diplotipo	RAPIDO	INTERMEDIO	LENTO
10	0000	100%	0%	0%
	0001	0 %	100%	0%
	0010	0%	100%	0%
15	0011	0%	0%	100%
	0100	0%	100%	0%
	0101	0%	0%	100%
20	0110	0%	0%	100%
	0111	0%	0%	100%
	1000	0%	100%	0%
	1001	0%	0%	100%
25	1010	0%	20%	80%
	1011	0%	0%	100%
	1100	0%	40%	60%
	1101	0%	0%	100%
30	1110	0%	0%	100%
	1111	0%	0%	100%

- 35 Por ejemplo, un individuo independientemente de su raza para el cual se hayan determinado los cuatro puntos polimórficos y que tiene un diplotipo 0010 será con toda certeza un acetilador intermedio. Sin embargo, si el individuo objeto de análisis tuviera el diplotipo 1010 tendría un 20% de probabilidades de ser acetilador intermedio y 80% de ser acetilador lento.

- 40 Para la predicción de fenotipo en individuos a los que no se les ha determinado alguno de los cuatro puntos polimórficos 191, 341, 590 y 857 se consulta la tabla 2 para cada uno de los fenotipos reconstruidos.

- 45 Por ejemplo para el caso del individuo oriental con el código 1103, para la reconstrucción del primero de los diplotipos posibles, el 1100, las posibilidades de que el fenotipo sea lento son del 60%, para que sea intermedio son 40% y para que sea rápido son 0%.

Sin embargo la reconstrucción 1100 es sólo una de las posibles. Existen otras dos reconstrucciones posibles que son 1101 y 1102.

- 50 Las probabilidades de que el paciente tenga un fenotipo lento con la reconstrucción 1101 son del 100% (véase la Tabla 2).

- 55 Finalmente, en el caso de la reconstrucción 1102, las probabilidades de un fenotipo lento son del 100%, ya que cumplen la premisa de que al tener un valor = 2 en el código, posee mutaciones en los dos genes (paterno y materno) y por lo tanto automáticamente se clasifica como fenotipo lento.

- 60 Una vez calculadas estas reconstrucciones y obtenida para cada una de ellas un valor de probabilidad de que el fenotipo sea lento, intermedio o rápido, se aplicará el factor de ponderación en función de las probabilidades de cada reconstrucción dependiendo del origen étnico del paciente que se obtuvo en la Tabla 1 y cuyos valores se almacenaron. Continuando con el ejemplo del paciente oriental con genotipo 1103, el cálculo se hará del siguiente modo:

		Probabilidad	Lento	Intermedio	Rápido
65	1100	75.4%	60.0%	40.0%	0%
	1101	22.9%	100%	0%	0%
	1102	1.7%	100%	0%	0%

Globalmente, la posibilidad de que el paciente con código 1103 tenga un fenotipo lento será $= (75.4 \cdot 60.0) + (22.9 \cdot 100) + (1.7 \cdot 100) = 69.8\%$. La probabilidad de que el fenotipo sea intermedio es $(75.4 \cdot 40.0) + (22.9 \cdot 0) + (1.7 \cdot 0) = 30.1\%$, y finalmente la probabilidad de que tenga un fenotipo rápido será $(75.4 \cdot 0) + (22.9 \cdot 0) + (1.7 \cdot 0) = 0\%$.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la desambiguación del fenotipo acetilante del gen NAT2 de un individuo que comprende las etapas de:

- (i) Determinación de al menos uno de los puntos polimórficos 191, 341, 590 y 857 del gen NAT2 de dicho individuo,
- (ii) Generación de un valor numérico de cuatro cifras, cada una de ellas correspondiente a cada uno de los puntos polimórficos determinados en (i), donde el número 0 implica que no existe ninguna mutación para dicho punto polimórfico, el número 1 implica que existe un alelo mutado y otro no mutado para dicho punto polimórfico, el número 2 implica que existen 2 alelos mutados para dicho punto polimórfico y el número 3 implica que no se determinó ese punto polimórfico de manera que:
 - a. Si se han determinado los 4 puntos polimórficos, se pasa a la etapa (iii).
 - b. Si no se han determinado los 4 puntos polimórficos se calculan las posibles combinaciones de puntos polimórficos no determinados en función de los factores de ponderación por origen étnico (obtención del factor de ponderación) según la siguiente tabla:

Posición	Caucásicos	Orientales	Africanos
191	0 = 98.9% 1 = 1.1% 2 = 0%	0 = 100% 1 = 0% 2 = 0%	0 = 87.8% 1 = 11.8% 2 = 0.4%
341	0 = 30.4% 1 = 49.5% 2 = 20.2%	0 = 93.5% 1 = 6.4% 2 = 0.1%	0 = 33.9% 1 = 48.6% 2 = 17.5%
590	0 = 52.9% 1 = 39.6% 2 = 7.4%	0 = 55.6% 1 = 37.9% 2 = 6.5%	0 = 54.8% 1 = 38.5% 2 = 6.8%
857	0 = 96.3% 1 = 3.7% 2 = 0%	0 = 75.4% 1 = 22.9% 2 = 1.7%	0 = 95.2% 1 = 4.8% 2 = 0.1%

y se pasa a la etapa (iii).

- (iii) Inferencia la probabilidad del fenotipo concreto del individuo mediante la siguiente tabla de conversión de diplotipos en fenotipos:

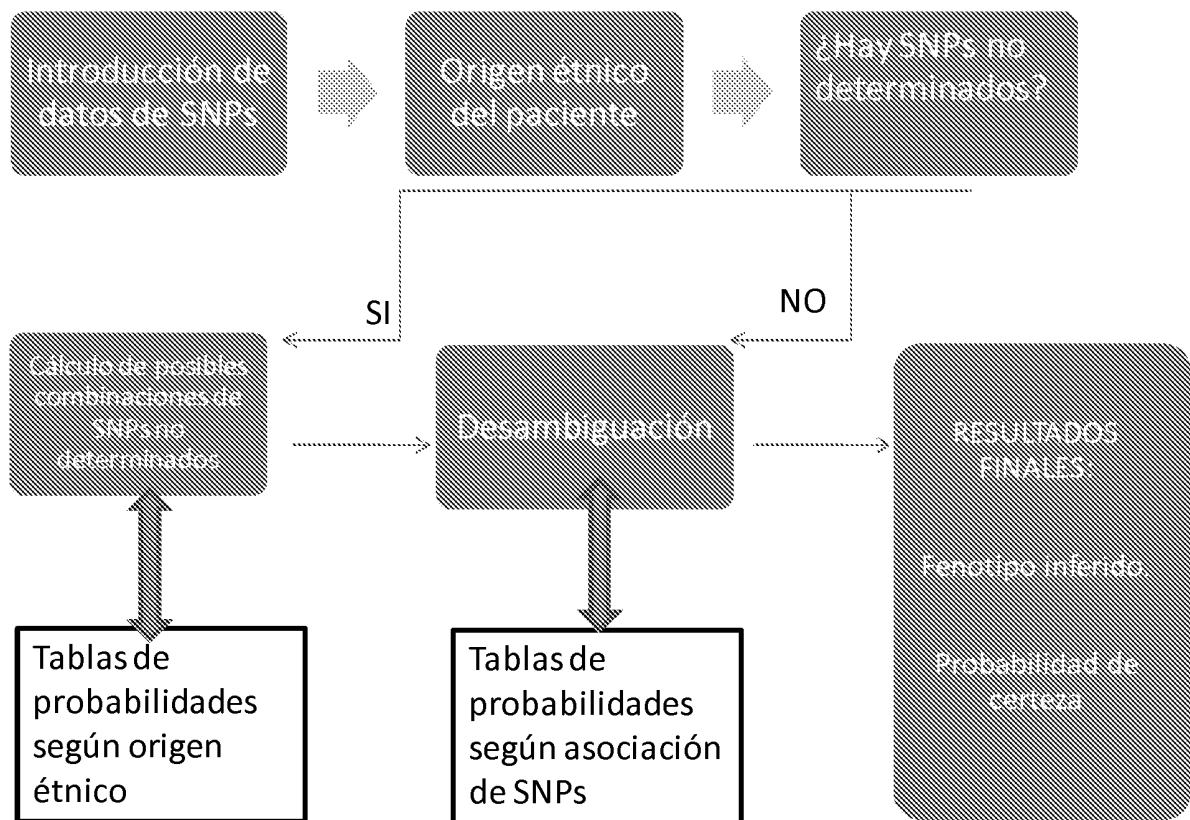
Diplotipo	RAPIDO	INTERMEDIO	LENTO
0000	100%	0%	0%
0001	0 %	100%	0%
0010	0%	100%	0%
0011	0%	0%	100%
0100	0%	100%	0%
0101	0%	0%	100%
0110	0%	0%	100%
0111	0%	0%	100%
1000	0%	100%	0%
1001	0%	0%	100%
1010	0%	20%	80%
1011	0%	0%	100%
1100	0%	40%	60%
1101	0%	0%	100%
1110	0%	0%	100%
1111	0%	0%	100%

- (iv). Aplicación de los factores de ponderación de origen étnico para cada diplotipo obtenidos en el paso iii en aquellos individuos en los que no se han determinado los cuatro puntos polimórficos para predecir la probabilidad de cada fenotipo.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 donde en el punto i) se determinan todos los puntos polimórficos 191, 341, 590 y 857 del gen NAT2.

3. Un programa informático que comprende medios de código de programa informático adaptados para realizar las etapas del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, cuando dicho programa se ejecuta en un ordenador, un procesador de señal digital, una disposición de puertas de campo programable, un circuito integrado de aplicación específica, un microprocesador, un microcontrolador, y cualquier otra forma de hardware programable.

Fig. 1



LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

5 <120> MÉTODO PARA LA DESAMBIGUACIÓN DEL METABOLISMO ACETILANTE DE UN INDIVIDUO

<130> 197/08

10 <160> 10

<170> PatentIn version 3. 3

15 <210> 1

<211> 17

<212> DNA

20 <213> Artificial

<220>

<223> cebador N1

25 <400> 1

aattagtcac acgagga
17

30

<210> 2

<211> 19

35 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

40 <223> cebador N2

<400> 2

45 tctagcatga atcactctg
19

50 <210> 3

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

55 <220>

<223> cebador para la amplificación de la posición 857 si 1vestre

60 <400> 3

aatagtaagg gatc
14

65 <210> 4

<211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador para la posición 857 mutada
 10 <400> 4

 aatagtaagg gatt
 14
 15
 <210> 5
 <211> 18
 20 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 25 <223> cebador para la posición 590 silvestre

 <400> 5
 30 caaaatcttc aattgttc
 18
 35 <210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> cebador para la posición 590 mutada
 <400> 6
 45
 caaaatcttc aattgttt
 18
 50
 <210> 7
 <211> 14
 <212> DNA
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador para la posición 341 silvestre
 60
 <400> 7

 attcctgccg tcaa
 14
 65

<210> 8
 <211> 14
 <212> DNA
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador para la posición 341 mutada
 10
 <400> 8

 attcctgccg tcag
 15 14

 <210> 9
 <211> 12
 20 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 25 <223> cebador para la posición 191 silvestre

 <400> 9
 30 accacccacc cc
 12

 35 <210> 10
 <211> 12
 <212> DNA
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador para la posición 191 mutada
 45
 <400> 10

 accacccacc ct
 50 12

 55

 60

 65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030214

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AGUNDEZ, JA. et al. Unraveling Ambiguous NAT2 Genotyping Data Clinical Chemistry. 2008. Volumen 54 (8), páginas 1390-1394, todo el documento.	1-3
A	GOLKA K. et al. Reconstruction of N-acetyltransferase 2 haplotypes using PHASE. Arch. Toxicol. 2008. Volumen 82, páginas 265-270, todo el documento.	1-3
A	GARCIA-MARTIN E. Interethnic and Intraethnic Variability of NAT2 Single Nucleotide Polymorphisms. Current Drug Metabolism. 2008. Volumen 9, páginas 487-497, todo el documento.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.02.2011

Examinador
M. García Grávalos

Página
1/5

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-3
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-3
Reivindicaciones

SI
NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	AGUNDEZ, JA. et al. Clinical Chemistry. 2008. Volumen 54 (8), páginas 1390-1394.	2008
D02	GOLKA K. et al. Archives of Toxicology. 2008. Volumen 82, páginas 265-270.	2008
D03	GARCIA-MARTIN E. Current Drug Metabolism. 2008. Volumen 9, páginas 487-497.	2008

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

La presente invención divulga un método para la desambiguación del metabolismo acetilante del gen NAT2 en un individuo, mediante la determinación de al menos uno de los puntos polimórficos 191,341, 590 y 857 de dicho gen; generando con estos datos un código numérico de cuatro cifras, una para cada uno de los puntos, según no se haya producido mutación (0), se produzca en un alelo (1), en ambos (2) o no se haya determinado (3); y aplicando un factor de ponderación según el origen étnico, así como una tabla de conversión de diplotipos en fenotipos para inferir la probabilidad del fenotipo (reivindicaciones 1-2). Reivindica también un programa informático con medios de código adaptado para realizar las etapas del método (reivindicación 3).

El documento D01 divulga un método de desambiguación del fenotipo acetilante en individuos de raza caucásica, mediante el análisis de haplotipos para siete polimorfismos comunes en el gen NAT2 (191, 282, 341, 481, 590, 803 y 857), aplicado en un estudio comparativo entre los resultados obtenidos con un método matemático, programa estadístico PHASE, y los obtenidos del genotipado del gen, que muestra la evolución natural (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un método para resolver la ambigüedad del genotipado del gen NAT2, mediante la aplicación de un algoritmo, del programa estadístico PHASE v2.1.1, que permite estimar que pares de haplotipos NAT2 serían los más probables, en el genotipado de este gen, a partir de los datos obtenidos en el análisis de siete polimorfismos de un solo nucleótido (191, 282, 341, 481, 590, 803 y 857), relevantes para individuos de raza caucásica (ver todo el documento).

El documento D03 divulga la variabilidad, interétnica e intraétnica de los siete polimorfismos comunes en el gen NAT2 (191, 282, 341, 481, 590, 803 y 857), analizando individualmente los datos sin procesar de cada polimorfismo en lugar de los haplotipos deducidos (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente solicitud es un método para la desambiguación del metabolismo acetilante del gen NAT2, que se basa en la determinación de al menos uno de los puntos polimórficos 191,341, 590 y 857 de dicho gen, y la aplicación de un factor de ponderación según el origen étnico y de una tabla de conversión de diplotipos en fenotipos.

1.1. REIVINDICACIONES 1-3

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica ya que anticipa un método de desambiguación del fenotipo acetilante del gen NAT2, mediante el análisis de haplotipos para siete polimorfismos comunes en este gen, entre los que se encuentran los cuatro reivindicados en la presente solicitud (191, 341, 590, y 857), generando un código numérico de siete cifras, una para cada uno de los puntos, según no se haya producido mutación (0), se produzca en un alelo (1), o en ambos (2). Anticipa también el estudio comparativo entre los genotipos reconstruidos con ayuda del programa estadístico PHASE y los obtenidos mediante el genotipado.

Los documentos D02 y D03 también anticipan métodos para resolver la ambigüedad del genotipado del gen NAT2, basándose en el análisis de los mismos puntos polimórficos divulgados en D01 y aplicando diferentes estudios estadísticos.

La función de la enzima NAT2 en el metabolismo hepático de los medicamentos es conocida en el estado de la técnica, así como los polimorfismos más habituales que se producen en el gen que la codifica, que son los responsables de que los individuos se clasifiquen en acetiladores lentos, medios o rápidos, y que muestren una mayor o menor probabilidad de padecer toxicidad y/o efectos secundarios frente a los fármacos. Sin embargo, el método de la presente invención difiere de los anteriores, en la reducción del número de puntos polimórficos a determinar y por otra parte, en el factor de ponderación y tabla de conversión aplicados, lo que supone una ventaja técnica al reducir el trabajo analítico y además, en que el método de la invención puede ser aplicado a cualquier individuo, independientemente de la raza a la que pertenezca. Por tanto, se considera que la combinación de ambas ventajas resulta inventiva ya que supone una mejora considerablemente respecto a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D03, las reivindicaciones 1-3 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).