



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 157**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05795708 .6**
96 Fecha de presentación : **24.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1813673**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **Marcador de identificación sensible a la terapia con interferón para el cáncer de las células renales.**

30 Prioridad: **28.10.2004 JP 2004-314160**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.08.2011

73 Titular/es: **OTSUKA PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**
9, Kandatsukasa-cho 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 101-8535, JP

72 Inventor/es: **Seki, Toyokazu;**
Shiratsuchi, Takayuki;
Ogawa, Osamu;
Naito, Seiji;
Tsukamoto, Taiji;
Toma, Hiroshi;
Hirao, Yoshihiko;
Kagawa, Susumu,;
Nose, Yoshiaki y
Nakamura, Tsuyoshi

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 364 157 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

Marcador de identificación sensible a la terapia con interferón para el cáncer de las células renales.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar un efecto en la supresión tumoral de la administración de interferón (respuesta al tratamiento) en cánceres de células renales utilizando un polimorfismo génico humano como indicación (marcador), un oligonucleótido utilizado en dicho procedimiento, y un kit de detección para dicho polimorfismo génico.

10 **Antecedentes de la técnica**

El cáncer de células renales es una enfermedad intratable con bajas velocidades de respuesta a cualquiera de las terapias practicadas actualmente, tales como la farmacoterapia que utiliza fármacos quimioterapéuticos, los fármacos inmunoterapéuticos, etc., la radioterapia, la operación quirúrgica y/o similares. Además, para cuando el cáncer de células renales es identificado, los casos que ya han desarrollado metástasis distante son supuestamente hasta de aproximadamente 30%. Excluyendo la operación quirúrgica, la inmunoterapia que utiliza interferones (IFN) entre las farmacoterapias anteriores, se considera particularmente la más eficaz; sin embargo, las velocidades de respuesta alcanzadas por dicha terapia son hasta sólo aproximadamente el 15% cuando se administra IFN- α solo, y 10 al 15% cuando se administra IFN- γ solo. Aun cuando se utiliza en combinación con agentes anticancerígenos, no existe ninguna otra terapia que proporcione un efecto mayor que el de la monoterapia de IFN- α . La inmunoterapia practicada actualmente que utiliza IFN es principalmente una terapia de mantenimiento a largo plazo con la sola utilización de IFN- α o la utilización combinada con IFN- γ .

Mientras tanto, el avance de las ciencias genómicas son farmacocinéticas de interpretación rápida y polimorfismos génicos de enzimas, proteínas, etc., que son aplicables a la sensibilidad a los fármacos. En el análisis del genoma humano, los polimorfismos mononucleotídicos (SNP) han estado recibiendo atención dado que los marcadores de polimorfismo génico se encuentran con más frecuencia. Dichos SNP son conocidos porque han sido útiles para analizar el genoma humano aplicable a las enfermedades corrientes, las respuestas a los fármacos, etc. (véase los documentos no de patente 1, 2 y 3). El análisis del haplotipo que utiliza varios SNP es también conocido porque ha sido útil para analizar la sensibilidad a las enfermedades (véase el documento no de patente 4).

Posteriormente, para introducir la denominada medicina a la carta para cada paciente, se han propuesto estudios para poner de manifiesto una relación entre un polimorfismo génico dado y la sensibilidad al fármaco/responsabilidad del fármaco de un paciente.

Un procedimiento conocido para predecir los efectos de la terapia con IFN analiza la relación de los SNP MxA-8/MxA123 MBL-221/MBL-CLDcodon54 en el genoma de un paciente infectado con VHC (virus de la hepatitis C humano (VHC humano)), con pacientes que responden a IFN- α (pacientes que responden a la terapia) y que no responden (pacientes que no responden a la terapia), prediciendo y evaluando de este modo el grado de la respuesta al tratamiento con IFN del paciente infectado con VHC (documento 1 de patente). Otro procedimiento conocido predice la respuesta al tratamiento con IFN que utiliza SNP en la región activadora y en la posición 134 del gen del receptor 2 de IFN- α , como marcadores de polimorfismo génico (documento 2 de patente). Este documento da a conocer enfermedades diana seleccionadas de entre el grupo constituido por hepatitis B, hepatitis C, glioblastoma, meduloblastoma, astrocitoma, melanoma maligno de la piel y hepatitis similares, cánceres renales, mieloma múltiple, leucemia de células del cuero cabelludo, leucemia mielógena crónica, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalitis vírica, zóster diseminado y varicela de un paciente con inmunosupresión, carcinoma anaplásico epifaríngeo, enfermedad infecciosa vírica del oído interno acompañada de hipoacusia, queratitis herpética, condiloma plano, condiloma acuminado, conjuntivitis producida por infección por adenovirus y/o herpesvirus, herpes genital, herpes labial, carcinoma del cuello uterino, hidrotórax canceroso, queratoacantoma, carcinoma de células basales y hepatitis δ activa crónica.

Además, para evaluar la respuesta de la terapia con IFN- α para la hepatitis C, un procedimiento también conocido consiste en medir la sustitución de guanina (G) a adenina (A) en la posición 196 en la región activadora del gen de IRF-1 (véase el documento 3 de patente).

Hasta la fecha, sin embargo, no ha existido ningún documento que informe específicamente de una relación entre la respuesta a la terapia con IFN a los cánceres de células renales y los SNP dados.

Para los pacientes que responden y que no responden a IFN- α , se han publicado ya varios centenares de perfiles de expresión génica (véase el documento 4 no de patente y el documento 4 de patente). Estos perfiles fueron creados utilizando tecnologías tales como los chips de ADN (oligonucleótidos de alta densidad o chips), despliegue diferencial, matrices diferenciales de ADNc, SAGE (análisis en serie de expresión génica), comparación de la base de datos de la etiqueta de la secuencia expresada o similares. Estos procedimientos fueron utilizados para analizar la expresión génica en el colon, mama, carcinoma de ovario, lesiones de esclerosis múltiple, leucemia y carcinomas

de células renales. El documento 4 no de patente incluye además genes tales como IRF2, STAT1, STAT2, STAT4, STAT5, STAT6, etc., sin embargo, no se da a conocer ninguno de los SNP de los genes específicos utilizados en la presente invención.

- 5 [Documento 1 de patente] Publicación nº 2003-88382 de patente Japonesa sin examinar
 [Documento 2 de patente] Publicación nº 2003-339380 de patente Japonesa sin examinar
 [Documento 3 de patente] Publicación nº 2001-136973 de patente Japonesa sin examinar
 10 [Documento 4 de patente] Publicación nº 2004-507253 de patente Japonesa sin examinar
 [Documento 1 no de patente] Brooks, A.J., "The essence of SNPs", *Gene*, USA, (1999), 234, 177-186
 15 [Documento 2 no de patente] Cargill, M. *et al.*, "Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes", *Nature Genet.*, USA, (1999), 22, 231-238
 [Documento 3 no de patente] Evans, W. E., & Relling, M.V., "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics", *Science*, USA, (1999), 286, 487-491
 20 [Documento 4 no de patente] Schlaak, J.F., *et al.*, "Cell-type and Donor-specific Transcriptional Responses to Interferon- α ", *J. Biol. Chem.*, (2002) 277, 51, 49428-49437

Descripción de la invención

25 Problemas que deben ser resueltos por la invención

Un objetivo principal de la presente invención consiste en proporcionar unos medios de evaluación de la respuesta terapéutica de la administración de interferón a cánceres de células renales (efecto sobre la supresión tumoral).

30 Medios para resolver los problemas

Para resolver los problemas mencionados anteriormente, se seleccionaron arbitrariamente 33 genes como candidatos para el análisis del polimorfismo génico, que incluían genes relacionados con IFN, genes supuestamente aplicables para la transducción de la señal de IFN- γ , y genes que supuestamente presentaban cambios de la expresión génica por adición/administración de IFN. Se investigaron los SNP en estos genes experimentales utilizando bases de datos públicas de polimorfismo y seleccionaron 463 SNP experimentales. A continuación, se determinó la diferencia de frecuencia de estos SNP seleccionados utilizando como ADN genómico muestras procedentes de dos grupos de pacientes: grupo que responde a IFN con efecto sobre la supresión tumoral en cánceres de células renales mediante la administración de IFN- α (pacientes que respondieron a la terapia) y el grupo que no respondía al IFN (pacientes que no respondían a la terapia). Como resultado, se ha descubierto que los SNP que presentan diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos anteriores están presentes en los 8 genes siguientes.

- 45 (1) Gen STAT3 (transductor de señal y activador de transcripción 3: STAT3 (nº NT 010755 de registro en GenBank)) (en adelante denominado "gen STAT3"),
 (2) gen SSI3 (supresor de la señalización 3 de citocina: SSI3 (nº NT_010641 de registro en GenBank)) (en adelante denominado "gen SSI3"),
 50 (3) gen IL-4R (receptor de interleucina 4 (nº NT_010393 de registro en GenBank)) (denominado en adelante "gen IL-4R"),
 (4) gen IRF2 (factor 2 regulador de interferón: IRF2 (nº NT_022792 de registro en GenBank)) (denominado en adelante "gen IRF2"),
 55 (5) gen ICSPB (proteína 1 de unión a la secuencia de consenso del interferón: ICSPB1 (nº NT_019609 de registro en GenBank)) (denominado en adelante "gen ICSPB1"),
 (6) gen PTGS1 (prostaglandina-endoperóxido sintasa 1: PTGS1 (nº NT_008470 de registro en GenBank)) (denominado en adelante "gen PTGS1"),
 60 (7) gen PTGS2 (prostaglandina-endoperóxido sintasa 2: PTGS2 (nº NT_004487 de registro en GenBank)) (denominado en adelante "gen PTGS2"), y
 65 (8) gen TAP2 (transportador, casete de unión a ATP, complejo 2 de histocompatibilidad mayor: TAP2 (nº NT_007592

de registro en GenBank)) (denominado en adelante "gen TAP2").

Se ha ampliado la investigación adicional acerca de la relación entre los SNP presentes en los genes anteriores y la respuesta de la terapia con IFN a los cánceres de células renales. Por lo tanto, se ha confirmado 16 SNP que son muy aplicables a los efectos de la supresión tumoral de la administración de IFN- α para los cánceres de células renales, y se pensó que éstos SNP pueden utilizarse como marcadores para evaluar los efectos de la supresión tumoral tras las terapias con IFN. Más específicamente, se ha descubierto que la detección de estos SNP permite la predicción de los efectos sobre la supresión tumoral de la administración de IFN (respuesta al tratamiento) para los cánceres de células renales (diagnóstico predictivo). Basándose en estos descubrimientos, la presente invención se ha realizado como resultado de estudios adicionales.

La presente invención proporciona un procedimiento para evaluar los efectos de la supresión tumoral mediante la terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales, tal como se describe en los artículos 1 a 11.

Artículo 1. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral mediante la terapia con IFN de un paciente con cáncer de células renales, procedimiento que comprende las etapas (i) a (iii) siguientes;

- (i) etapa de preparación de un ADN genómico o de una cadena complementaria del mismo de por lo menos el gen STAT3, utilizando la muestra del gen extraída de un paciente con cáncer de células renales
- (ii) etapa de análisis de la secuencia de ADN del ADN genómico o de la cadena complementaria del mismo, y determinación del polimorfismo génico del mismo, y
- (iii) etapa de evaluación de la supresión tumoral por terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales, utilizando como marcador por lo menos un polimorfismo génico determinado en la etapa (ii) anterior.

Artículo 2. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral mediante terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales, según el Artículo 1, en el que el polimorfismo génico es un polimorfismo de por lo menos el gen STAT3.

Artículo 3. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral por terapia con IFN en un paciente con un cáncer de células renales, según el Artículo 1, en el que el polimorfismo génico es por lo menos uno seleccionado de entre el grupo constituido por (a) a (d) a continuación y opcionalmente seleccionado además de entre el grupo constituido por (e) a (p) a continuación:

- (a) polimorfismo génico (STAT3-2) con genotipo C/T o T/T en la posición 4243095 del gen STAT3, y representado por el número: rs1905341 de ID de SNP de referencia,
- (b) polimorfismo génico (STAT3-3) con genotipo C/C en la posición 4264926 del gen STAT3, y representado por el número: rs4796793 de ID de SNP de referencia,
- (c) polimorfismo génico (STAT3-17) con genotipo G/G en la posición 4204027 del gen STAT3, y representado por el número: rs2293152 de ID de SNP de referencia,
- (d) polimorfismo génico (STAT3-18) con genotipo C/T en la posición 4050541 del gen STAT3, y representado por el número: rs2293153 de ID de SNP de referencia,
- (e) polimorfismo génico (SSI3-1) con genotipo A/C en la posición 10246541 del gen SSI3, y representado por el número: rs2280148 de ID de SNP de referencia,
- (f) polimorfismo génico (IL-4R-22) con genotipo A/A en la posición 18686025 del gen IL-4R, y representado por el número: rs1805011 de ID de SNP de referencia,
- (g) polimorfismo génico (IRF2-67) con genotipo A/A en la posición 17736877 del gen IRF2, y representado por el número: rs2797507 de ID de SNP de referencia,
- (h) polimorfismo génico (IRF2-82) con genotipo C/C en la posición 17744613 del gen IRF2, y representado por el número: rs796988 de ID de SNP de referencia,
- (i) polimorfismo génico (ICSPB-38) con genotipo A/A o C/C en la posición 390141 del gen ICSPB, y representado por el número: rs2292982 de ID de SNP de referencia,
- (j) polimorfismo génico (PTGS1-3) con genotipo C/T en la posición 26793813 del gen PTGS1, y representado por el número: rs1213264 de ID de SNP de referencia,
- (k) polimorfismo génico (PTGS1-4) con genotipo C/T en la posición 26794182 del gen PTGS1, y representado por el

número: rs1213265 de ID de SNP de referencia,

(l) polimorfismo génico (PTGS1-5) con genotipo A/G en la posición 26794619 del gen PTGS1, y representado por el número: rs1213266 de ID de SNP de referencia,

(m) polimorfismo génico (PTGS2-12) con genotipo G/G en la posición 15697329 del gen PTGS2, y representado por el número: rs2745557 de ID de SNP de referencia,

(n) polimorfismo génico (TAP2-5) con genotipo G/G en la posición 23602539 del gen TAP2, y representado por el número: rs2071466 de ID de SNP de referencia,

(o) polimorfismo génico (IL-4R-14) con genotipo C/C en la posición 18686068 del gen IL-4R, y representado por el número: rs2234898 de ID de SNP de referencia, y

(p) polimorfismo génico (IL-4R-29) con genotipo T/T en la posición 18686553 del gen IL-4R, y representado por el número: rs1801275 de ID de SNP de referencia.

Artículo 4. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral mediante terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales, según el Artículo 3, en el que el polimorfismo génico es cualquiera de (a), (f), (h), (n), (o) y (p) del Artículo 3.

Artículo 5. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral por terapia con IFN en un paciente con un cáncer de células renales, según cualquiera de los Artículos 1 a 4, en el que el IFN se selecciona de entre el grupo constituido por IFN- α , IFN- α recombinante e IFN- γ recombinante.

Artículo 6. Procedimiento según cualquiera de los Artículos 1 a 5, en el que el polimorfismo génico está determinado por lo menos un procedimiento seleccionado de entre el grupo constituido por secuenciación directa, análisis de hibridación de transferencia puntiforme (dot blot) de oligonucleótido específico del alelo (ASO), ampliación del cebador mononucleotídico, análisis del polimorfismo de configuración monocatenario (SSCP) por RCP, análisis del polimorfismo con longitud del fragmento de restricción (RFLP) por RCP, procedimiento invasivo, RCP cuantitativa en tiempo real y matriz de masas utilizando un espectrómetro de masas.

Artículo 7. Procedimiento según el Artículo 6, en el que el polimorfismo génico es determinado por el procedimiento invasivo o por secuenciación directa.

Artículo 8. Procedimiento según el Artículo 6, en el que el polimorfismo génico es determinado por el análisis RCP-RFLP.

Artículo 9. Procedimiento según el Artículo 8, en el que el análisis RCP-RFLP detecta, utilizando una enzima de restricción MspI, una mutación desde G hasta C en la posición 4204027 de intrón del gen STAT3 humano: rs2293152.

Artículo 10. Procedimiento según el Artículo 6, en el que el polimorfismo génico se determina utilizando por lo menos un oligonucleótido seleccionado de entre el grupo constituido por (a) a (p) siguiente como sonda o cebador de polimorfismo génico:

(a) oligonucleótido con una secuencia constituida por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T o T/T en la posición 4243095 del gen STAT3, y está representado por número de ID de SNP de referencia: rs1905341,

(b) oligonucleótido con una secuencia constituida por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/C en la posición 4264926 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs4796793,

(c) oligonucleótido con una secuencia constituida por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo G/G en la posición 4204027 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293152,

(d) oligonucleótido con una secuencia constituida por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T en la posición 4050541 del gen STAT3 (KCNH4), y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293153,

(e) oligonucleótido con una secuencia constituida por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/C en la posición 10246541 del gen SSI3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2280148,

- (f) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/A en la posición 18686025 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1805011,
- 5 (g) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/A en la posición 17736877 del gen IRF2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2797507,
- 10 (h) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/C en la posición 17744613 del gen IRF2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs796988,
- 15 (i) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/A o C/C en la posición 390141 del gen ICSPB, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2292982,
- 20 (j) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T en la posición 26793813 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213264,
- 25 (k) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T en la posición 26794182 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213265,
- 30 (l) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/G en la posición 26794619 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213266,
- 35 (m) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo G/G en la posición 15697329 del gen PTGS2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2745557,
- 40 (n) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo G/G en la posición 23602539 del gen TAP2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2071466,
- 45 (o) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/C en la posición 18686068 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2234898, y
- 50 (p) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo T/T en la posición 18686553 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1801275.
- 55 Artículo 11. Procedimiento según el Artículo 6, en el que el par cebador para la detección del polimorfismo génico es cualquiera de (a) a (p) siguiente y opcionalmente seleccionado además del grupo constituido por (e) a (p) siguiente:
- (a) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 1 y nº 17,
- 60 (b) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 2 y nº 18,
- (c) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 3 y nº 19,
- 65 (d) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 4 y nº 20,
- (e) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 5 y nº 21,
- (f) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 6 y nº 22,
- 70 (g) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 7 y nº 23,
- (h) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 8 y nº 24,
- (i) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 9 y nº 25,
- 75 (j) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 10 y nº 26,

- (k) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 11 y nº 27,
 (l) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 12 y nº 28,
 (m) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 13 y nº 29,
 (n) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 14 y nº 30,
 (o) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 15 y nº 31, y
 (p) par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 16 y nº 32.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para detectar un marcador de identificación sensible a la terapia con IFN para el cáncer de células renales, comprendiendo el procedimiento en particular detectar un polimorfismo génico humano específico o un genotipo de una muestra de un paciente con cáncer de células renales, y evaluar la respuesta al tratamiento con IFN (efecto de supresión tumoral) de dicho paciente, un kit para el mismo, y polimorfismos génicos, genotipos y sondas y cebadores de detección de genotipo utilizados en el procedimiento y en el kit. Estos son útiles para determinar la prioridad de selección del fármaco en la puesta en práctica de la medicina a la carta para cada uno de los pacientes.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Las abreviaturas para aminoácidos, péptidos, secuencias de bases, ácidos nucleicos, etc. utilizadas en la presente memoria son conformes a las regulaciones de la IUPAC-IUB (comunicación de la IUPAC-IUB sobre nomenclatura biológica, *Eur. J. Biochem.*, 138:9 (1984)), (“Enki-hairetsu mataha aminosan-hairetsu wo fokumu meisaisho nado no sakusei no tamenno gaidorain” (Guidelines for preparation of specifications containing base sequences or amino acid sequences” (compilado por la Japan Patent Office)), y las indicaciones normales utilizadas en los campos mencionados.

“Polimorfismo génico” y “polimorfismo” utilizados en la presente memoria se refieren a una diversidad de grupos alelos que ocupan un locus en un alelo individual en dichos grupos. Entre estos polimorfismos, los que presentan solamente un nucleótido que es diferente se denominan polimorfismos mononucleotídicos, o SNP. El polimorfismo mononucleotídico se abrevia con “SNP” en la presente memoria.

Haplotipo indica el tipo de los polimorfismos génicos (SNP) anteriores, expresado basándose en las clases y números de alelos en una diversidad de sitios de SNP en las regiones genéticas o grupos génicos continuos.

En la presente memoria, genotipo se refiere al estado de los alelos en un locus génico de un sitio del polimorfismo génico dado. El genotipo de SNP en la posición 4243095 en el gen STAT3 (STAT3-2) se expresa, por ejemplo, como C/T heterocigoto o T/T homocigoto. Éste se expresa también como “STAT3-2 C/T o T/T”. Cuando un paciente tiene el genotipo STAT3-2 C/T o T/T, el paciente está previsto que responda probablemente (PR: respuesta parcial) o responda bien (CR: respuesta completa) a la terapia con IFN para cánceres de células renales (efecto de supresión tumoral). Por lo tanto, el genotipo STAT3-2 C/T o T/T pueden utilizarse como marcadores de identificación sensibles a la terapia con IFN para cánceres de células renales.

Las secuencias genómicas de los genes humanos indicados en la presente memoria según las secuencias de ácido nucleico registradas con números de registro en el GenBank (por ejemplo: NT_010641) en el banco de datos con secuencia de ácido nucleico de la NCBI (National Center for Biotechnology Information). La información de los sitios y la información de la mutación del ácido nucleico de los SNP denominados polimorfismos génicos humanos en la presente invención se encuentran así mismo bajo los números de ID de SNP de referencia (por ejemplo: rs1213265) en el banco de datos de SNP de la NCBI (véase Reference SNP (refSNP) Cluster Report, que puede buscarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Las informaciones del SNP utilizadas en la presente memoria están también identificadas según los números de ID de SNP de referencia.

La Tabla 1 presenta la información general sobre secuencias genéticas, secuencias de ARNm y sitios de SNP y la mutación de ácido nucleico, obtenidos en el GenBank.

Tabla 1

Gen	rs nº	Acido nucleico	Registro de cóntigo	Posición de cóntigo	ARNm	Orientación del ARNm	Proteína	Sitio	Alelo dbSNP	Resto de aminoácido	Sitio del codón	Secuencia info de aminoácidos	Notas
STAT3-2	rs1905341	C/T	NT_010755	4243095	NM_003150	invertida		no traducido					
STAT3-3	rs4796793	G/C	NT_010755	4264708	-			locus					
STAT3-18	rs2293153	C/T	NT_010755	4050541	NM_012285	invertida	NP_036417	intrón					KCNH4
STAT3-17	rs2293152	G/C	NT_010755	4204027	NM_003150	invertida	NP_003141	intrón					
SSI3-1	rs2280148	A/C	NT_010641	10246541				locus					
IL-4R-14	rs2234898	A/C	NT_010393	18686068	NM_000418	complementaria	NP_000409	referencia del cóntigo sinónima	T	Leu [L]	3	414	
IL-4R-29	rs1801275	C/T	NT_010393	18686553	NM_000418	complementaria	NP_000409	referencia del cóntigo no sinónima	T	Leu [L]	3	433	
IL-4R-22	rs1805011	C/A	NT_010393	18686025	NM_000418	complementaria	NP_000409	referencia del cóntigo sinónima	G	Arg [R]	2	576	
IRF2-67	rs2797507	A/C	NT_022792	17736877	NM_002199	invertida	NP_002190	Intrón	A	Gln [Q]	2	576	
IRF2-82	rs796988	C/T	NT_022792	17744613	NM_002199	invertida	NP_002190	intrón	C	Ala [A]	2	400	
ICSPB-38	rs2292982	A/C	NT_019609	390141	NM_002163	complementaria	NP_002154	intrón	A	Glu [E]	2	400	
PTGS1-3	rs1213264	C/T	NT_008470	26793813	NM_080591	complementaria	NP_542158	intrón					
PTGS1-4	rs1213265	C/T	NT_008470	26794182	NM_080591	complementaria	NP_542158	intrón					
PTGS1-5	rs1213266	A/G	NT_008470	26794619	NM_080591	complementaria	NP_542158	intrón					
PTGS2-12	rs2745557	A/G	NT_004487	15697329	NM_000963	Invertida	NP_000954	intrón					
TAP2-5	rs2071466	G/A	NT_007592	23602539	NM_018833	invertida	NP_061313	intrón					

En la Tabla 1, la columna Gen muestra las denominaciones de los genes en la que están contenidos los SNP descubiertos en el contexto de la presente invención, seguida por los números de SNP asignados de forma arbitraria en el contexto de la presente invención. En la Tabla, "rs n^o" indica los números de registro de los SNP de referencia, "Ácido nucleico" indica la mutación del ácido nucleico (A/G significa el SNP en el que una A se cambia por una G), "registro del cóntigo" indica los números de registro para la secuencia genómica del cóntigo, "posición del cóntigo" indica los números de posición que señalan la posición de la mutación del ácido nucleico en una secuencia genómica, "ARNm" indica los números de registro para los números de la secuencia del ARNm y "orientación del ARNm" indica la orientación del ARNm que contiene secuencias de polimorfismo génico. Además, "proteína" indica los números de registro para las secuencias proteicas, "Posición" indica la información del sitio en el que están presentes los polimorfismos génicos, "alelo dbSNP" indica la información del ácido nucleico en alelos en dobles cadenas complementarias, "resto de aminoácido" indica los cambiados (sustituídos). "Sitio del codón" indica la información en los órdenes de sitio del codón para los aminoácidos codificados por ácido nucleico, "información de la secuencia de aminoácidos" indica la información en los sitios de las secuencias de aminoácidos y "Notas" indica sinónimos de genes.

Como se muestra en la Tabla 1, las sustituciones de aminoácidos producidas por polimorfismos génicos humanos específicos utilizados en el procedimiento de la presente invención están identificadas solamente en los polimorfismos génicos aplicables para IL-4R, y las sustituciones de aminoácidos no son producidas por los polimorfismos génicos de otros genes.

El término "gen" utilizado en la presente memoria comprende no solamente los ADN bicatenarios, sino también los ADN monocatenarios (de cadena transcrita y de cadena complementaria) que componen los ADN bicatenarios. Más específicamente, a menos que se indique de otra manera, los genes (los ADN) según la presente invención comprenden los ADN bicatenarios incluyendo los ADN genómicos humanos, los ADN monocatenarios (cadena transcrita) incluyendo los ADNc, los ADN monocatenarios con secuencias complementarias a dicha cadena transcrita y fragmentos de los mismos. Además, dichos genes (ADN) pueden incluir la zona reguladora, la zona de codificación, exón e intrón. Los polinucleótidos comprenden el ARN y el ADN. El ADN comprende ADNc, ADN genómico y ADN sintético. Los polipéptidos incluyen fragmentos, homólogos, derivados y variantes de los mismos. Además, variantes se refieren a las variantes de alelo naturales, las que no son naturales, las que son modificadas (eliminación, sustitución, adición e inserción) y las secuencias polinucleotídicas que no cambian sustancialmente las funciones de los polipéptidos codificadores. Las modificaciones de las secuencias de aminoácidos pueden producirse de forma natural, por ejemplo, mutación y modificación después de la traducción, o alternativamente, la modificación puede producirse de manera artificial utilizando elementos génicos naturales.

La presente invención se lleva a cabo basándose en los descubrimientos del polimorfismo génico que contiene un genotipo en un sitio dado de los genes humanos (genes IFN, genes supuestamente aplicables para el sistema de transducción de señal de IFN- γ , genes que presentan supuestamente cambios de expresión génica por adición/administración de IFN), particularmente el SNP o los SNP, está muy correlacionado con los efectos de supresión tumoral de la terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales, y la detección de dicho polimorfismo génico (un genotipo en un sitio dado) permite la evaluación de la respuesta a la terapia con IFN de un paciente con cáncer de células renales. En otras palabras, la presente invención se lleva a cabo basándose en el descubrimiento de que determinados polimorfismos génicos humanos, particularmente los SNP específicos, pueden utilizarse como marcadores de evaluación para la respuesta a la terapia con IFN a los cánceres de células renales. Según la presente invención, la detección de los SNP específicos de una muestra de un paciente con cáncer de células renales permite la predicción de la respuesta a la terapia con IFN del paciente con cáncer de células renales.

La presente invención requiere esencialmente la detección de polimorfismos génicos humanos específicos procedentes de una muestra de un paciente con cáncer de células renales, es decir, polimorfismos génicos (genotipos) constituidos por STAT3-2, STAT3-3, STAT3-17, STAT3-18, SSI3-1, IL-4R-14, IL-4R-22, L-4R-29, IRF2-67, IRF2-82, ICSPB-38, PTGS1-3, PTGS1-4, PTGS1-5, PTGS2-12, y TAP2-5.

Los SNP que deben ser detectados (tipados) por el procedimiento de la invención, es decir, polimorfismos génicos (o genotipos) correlativos con los efectos de la supresión tumoral de la terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales, son más específicamente los presentados en los apartados (a) a (p) a continuación.

(a) polimorfismo génico (STAT3-2) con genotipo C/T o T/T en la posición 4243095 del gen STAT3, y representado por el número: rs1905341 de ID de SNP de referencia,

(b) polimorfismo génico (STAT3-3) con genotipo C/C en la posición 4264926 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs4796793,

(c) polimorfismo génico (STAT3-17) con genotipo G/G en la posición 4204027 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293152,

(d) polimorfismo génico (STAT3-18) con genotipo C/T en la posición 4050541 del gen STAT3 (KCNH₄), y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293153,

- (e) polimorfismo génico (SSI3-1) con genotipo A/C en la posición 10246541 del gen SSI3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2280148,
- 5 (f) polimorfismo génico (IL-4R-22) con genotipo A/A en la posición 18686025 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1805011,
- (g) polimorfismo génico (IRF2-67) con genotipo A/A en la posición 17736877 del gen IRF2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2797507,
- 10 (h) polimorfismo génico (IRF2-82) con genotipo C/C en la posición 17744613 del gen IRF2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs796988,
- (i) polimorfismo génico (ICSPB-38) con genotipo A/A o C/C en la posición 390141 del gen ICSPB, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2292982,
- 15 (j) polimorfismo génico (PTGS1-3) con genotipo C/T en la posición 26793813 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213264,
- (k) polimorfismo génico (PTGS1-4) con genotipo C/T en la posición 26794182 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213265,
- (l) polimorfismo génico (PTGS1-5) con genotipo A/G en la posición 26794619 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213266,
- 25 (m) polimorfismo génico (PTGS2-12) con genotipo G/G en la posición 15697329 del gen PTGS2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2745557,
- (n) polimorfismo génico (TAP2-5) con genotipo G/G en la posición 23602539 del gen TAP2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2071466,
- 30 (o) polimorfismo génico (IL-4R-14) con genotipo C/C en la posición 18686068 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2234898, y
- (p) polimorfismo génico (IL-4R-29) con genotipo T/T en la posición 18686553 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1801275.

Según la presente invención, la detección de polimorfismos génicos humanos específicos (los SNP y los haplotipos) y/o los genotipos pueden proporcionar información y unos medios útiles para comprender y elucidar los efectos los mecanismos de la supresión tumoral y (efectos de la supresión tumoral de IFN) en cánceres de células renales, diagnóstico predictivo del tratamiento del cáncer de células renales, etc. Además, según la presente invención, dicha detección puede proporcionar información válida para determinar el protocolo de tratamiento para pacientes con cáncer de células renales, particularmente la información importante para determinar si debería administrarse o no IFN como protocolo de tratamiento en la práctica de la medicina a la medida de cada paciente de cáncer de células renales.

40

45

En la presente invención, los ejemplos de IFN utilizados en las terapias con IFN para los pacientes con cánceres de células renales incluyen IFN- α natural, IFN- α recombinante e IFN- γ recombinante, etc. Estos IFN pueden incluirse en los procedimientos de la presente invención no solamente cuando se utilizan individualmente, sino también cuando se utilizan en combinación con fármacos inmunoterapéuticos, fármacos quimioterapéuticos, etc.

50

Obtención de genes humanos que contienen polimorfismos génicos (SNP)

La presente invención se describe con detalle a continuación. En la presente invención, las muestras genéticas de un paciente con cáncer de células renales se obtienen en primer lugar como muestra (etapa i). Las muestras genéticas obtenidas contienen polimorfismos génicos específicos (SNP), más específicamente, alguno de los polimorfismos génicos mencionados anteriormente del apartado (a) al (p). Los ejemplos utilizables de dichas muestras son ADNc y ADN genómico extraído de un paciente con cáncer de células renales, por un procedimiento convencional. La muestra puede ser una cadena complementaria de ADN que contiene los polimorfismos génicos mencionados anteriormente.

55

60

Los ejemplos del origen de las muestras de ADNc o de ADN genómico pueden incluir varias células, tejidos, células cultivadas procedentes de los mismos, etc. Los ejemplos más específicos incluyen los fluidos corporales tales como sangre, saliva, linfa, mucosidad del tracto respiratorio, orina, esperma, etc. Las muestras procedentes de los orígenes anteriores como muestra procede preferentemente del ADN o del ADN genómico de un paciente antes de la administración de IFN (específicamente, incluyendo los casos en los que no se administra ningún fármaco por

65

completo, además de los casos en los que se han administrado ya otros fármacos aparte de IFN. El aislamiento del ARN, el aislamiento y purificación del ARNm, la síntesis del ADNc y la clonación de estas muestras originales puede realizarse según procedimientos normalizados.

5 En el procedimiento de la presente invención, se preparan las secuencias genómicas de genes humanos específicos o cadenas complementarias de los mismos (por ejemplo, genes o cadenas complementarias de los mismos que contienen alguno de los polimorfismos génicos anteriores (a) a (p) (SNP)) procedentes de las muestras genéticas anteriores (etapa ii).

10 La preparación puede realizarse fácilmente haciendo referencia a la información de la secuencia específica en los genes que contienen cualquiera de los SNP anteriores (a) a (p) dados a conocer en la presente memoria por la técnica de ingeniería genética común siguiente [Molecular Cloning, 2ª edición, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Zoku Seikagaku Jikken Koza: Idenshi Kenkyuho I, II, III ("Biochemistry Experiment Lecture Part II: Gene Studies I, II, III"), compilado por la Sociedad Japonesa de Bioquímica (1986), etc.]. Específicamente, la preparación del ADNc o del ADN genómico extraído de un paciente con cáncer de células renales que tiene algunos polimorfismos génicos de (a) a (p) descritos anteriormente pueden realizarse utilizando una sonda o enzima de restricción adecuadas para algunos de los genotipos específicos de (a) a (p) siguiendo procedimientos normalizados (por ejemplo, véase *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 78,6613 (1981); *Science*, 222, 778 (1983), etc.). Más específicamente, la preparación puede conseguirse preparando una sonda que contiene un sitio de genotipo que puede unirse selectivamente a las secuencias de ADN de los SNP deseados, y realizar la ampliación del cebador mononucleotídico, el procedimiento invasivo, la RCP cuantitativa en tiempo real, o similares utilizando dicha sonda.

20 Los cebadores de identificación utilizables son los cebadores directos y los cebadores inversos que se diseñan basándose en la información de la secuencia de ácidos nucleicos de los genes deseados. Estos cebadores pueden sintetizarse siguiendo procedimientos normalizados que utilizan, por ejemplo, un sintetizador automático. Dichas sondas de identificación están marcadas de forma típica; sin embargo, pueden utilizarse sondas no marcadas siempre y cuando sean directa o indirectamente capaces de unirse específicamente a un ligando marcado. Los agentes de marcado y las técnicas para las sondas y los ligantes son bien conocidos en los campos técnicos relacionados. Los ejemplos incluyen reactivos radioactivos que pueden transferirse por traslación de muescas, cebado aleatorio, tratamiento con cinasa, etc., biotina, colorantes fluorescentes, reactivo quimioluminiscente, luciferasa y enzimas, anticuerpos o similares.

25 El ADN o ARNm extraído puede ampliarse por procedimientos de ampliación genética. Por ampliación, puede conseguirse detección más fácil y más precisa por el procedimiento de la presente invención. Los ejemplos de procedimientos de ampliación genética incluyen el procedimiento de la RCP (Saiki, R. K., Bugawan, T. L. *et al.*, *Nature*, 324, 163-166 (1986)), el procedimiento NASBA (Compton, J., *Nature*, 650, 91-92 (1991)), el procedimiento TMA (Kacian, D. L., y Fultz, T. J., patente US nº 5.399.491 (1995)), el procedimiento SDA (Walker, G. T., Little, M. C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 89,392-396 (1992)), etc.

40 El aislamiento y purificación de los fragmentos génicos ampliados por el procedimiento de la RCP, etc. pueden realizarse por electroforesis en gel o utilizando una columna. Estos rendimientos, pueden verificarse, por ejemplo, por el procedimiento espectral de masas o electroforesis en gel de agarosa. Los genes ampliados por estos procedimientos están sometidos a la detección de los polimorfismos génicos (a) a (p) (los SNP) de la presente invención (tipado del SNP) según la propiedad del gen ampliado.

45 Tipado de SNP

Según el procedimiento de la presente invención, el ADN de una zona génica dada del espécimen anterior se secuencia y analiza, y los SNP de las mismas se detectan (tipado de SNP) (etapa iii). El tipado puede realizarse por los procedimientos (1) al (8) a continuación.

(1) Secuenciación directa de nucleótidos

55 Los polimorfismos génicos pueden detectarse por secuenciación del ADN de un gen dado, siguiendo los procedimientos de secuenciación directa de nucleótidos utilizados de forma rutinaria para determinar las secuencias de ácido nucleico en este tipo de gen, tal como el procedimiento didesoxi (Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 74, 5463-5467 (1977)), el procedimiento de Maxam-Gilbert (Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)), etc. Los polimorfismos génicos pueden detectarse también de manera eficaz por la combinación del procedimiento de secuenciación directa de nucleótidos y un procedimiento de ampliación de ADN tal como el procedimiento de la RCP. En particular, un procedimiento combinado del procedimiento de la RCP o un equivalente de la ampliación del ADN al mismo y dicho procedimiento de secuenciación directa se realiza preferentemente en vista de la operación conveniente y fácil así como la detección sensible y precisa conseguida, a pesar de una pequeña cantidad de muestra de ADN requerida.

65 Dicho procedimiento preferido puede realizarse básicamente, por ejemplo, sometiendo fragmentos génicos ampliados por el procedimiento de la RCP o los productos purificados de los mismos para dirigir la secuenciación

según el procedimiento dideoxi, el procedimiento de Maxam-Gilbert, etc. Alternativamente, dicho procedimiento puede conseguirse fácilmente determinando la secuencia de nucleótidos que utiliza un kit con la secuencia comercial. De este modo, puede detectarse la presencia o ausencia de los SNP en las posiciones dadas mencionadas anteriormente de los genes humanos específicos.

5 Los fragmentos de ADN que deben ampliarse por RCP en los procedimientos anteriores y en adelante no están limitados siempre y cuando contengan por lo menos un sitio específico en el que las variaciones mencionadas se encuentren más fácil y probablemente. Los fragmentos de ADN constan por lo general de aproximadamente 50 a
10 aproximadamente varios cientos de bases, y más preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente varios centenares de bases.

(2) Análisis de hibridación de transferencia puntiforme del oligonucleótido específico para el alelo (ASO)

15 Otro procedimiento para detectar polimorfismos en genes específicos es el del análisis de hibridación de transferencia puntiforme del oligonucleótido específico del alelo (ASO) siguiente (Conner, B. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 80, 278-282 (1983)). Este procedimiento puede realizarse sometiendo el fragmento de ADN hibridable con sondas oligonucleótidas específicas para un alelo de un fragmento de gen ampliado por RCP, utilizando cebadores directos y cebadores inversos diseñados para meter un SNP diana, para análisis de hibridación
20 de transferencia puntiforme. De esta manera, puede detectarse el SNP de dichos fragmentos de ADN.

(3) Ampliación del cebador mononucleotídico

25 La detección del polimorfismo en genes específicos puede conseguirse también por un procedimiento basado en las ampliaciones del cebador mononucleotídico tal como por el procedimiento SNaPshot, pirosecuenciación y detección de la mutación puntual, que se dio a conocer en la publicación de patente japonesa sin examinar nº 2000-279197. En estos procedimientos, una sonda concebida con el fin de emparejar la secuencia inmediatamente o varias bases antes de un SNP diana, es decir, la sonda diseñada para que el extremo 3' de la misma esté colocado en una base corriente arriba de la mutación diana de detección o próxima, se hibrida a una muestra de ADN. Estos procedimientos pueden realizarse utilizando un kit de detección de SNP comercial y un programa informático
30 acompañado a la misma.

Por ejemplo, el procedimiento SnaPshot puede realizarse utilizando el kit de ampliación del cebador SnaPshot ddNTP de ABI PRISM (preparado por Applied Biosystems). Los SNP pueden tiparse utilizando fragmentos fluorescentes producidos después de la reacción en el analizador ABI PRISM310/377/3100/3700ADN (preparados
35 todos por Applied Biosystems) y el programa informático GeneScan.

40 La pirosecuenciación puede realizarse de la forma siguiente. Se aísla ADN genómico de la muestra de sangre, etc. siguiendo de una manera convencional, a partir de docenas a varios cientos de bases que contienen mutaciones se amplían por RPC utilizando cebador marcado con biotina, se purifica un ADN monocatenario utilizando perlas magnéticas, y el ADN purificado se utiliza como muestra. Un cebador está hibridado a esta muestra el cual se diseña con el fin de secuenciar desde varias bases corriente arriba de un polimorfismo génico diana, y a continuación una clase de dNTP de una vez se añade a éste según la secuencia próxima al polimorfismo génico introducido en un programa informático, produciendo de este modo una reacción. Ya que el pirofosfato (PPi) se forma cuando la ADN polimerasa amplía los ácidos nucleicos, PPi produce ATP por sulfurilasa. La luminiscencia emitida por una reacción
45 de luciferasa a este sustrato de ATP se determina utilizando un detector de luminiscencia, cámara CCD, etc. De este modo, el tipado del gen diana se hace factible por el análisis del pico de la luminiscencia emitida según los dNTP añadidos. Este procedimiento permite que se tipifiquen 96 muestras en aproximadamente 15 minutos.

50 Pueden utilizarse reactivos y aparatos corrientes en el procedimiento anterior. Ejemplos de reactivos utilizables incluyen la mezcla de enzimas constituida por ADN polimerasa, ATP-sulfurilasa, luciferasa y apirasa, sustrato líquido constituido por luciferina y APS (5'fosfato sulfato de adenosina) kit de reactivo SNP comerciales que comprenden dNTP como componente constituido por dATP (trifosfato de desoxiadenosina), dCTP, dGTP y dTTP (fabricados por Pyrosequencing AB), etc. Los ejemplos de aparatos utilizables incluyen el sistema PSQ96 para el análisis automático de la secuencia de ADN (fabricado por Pyrosequencing AB) y el programa informático SNP para utilizar
55 el sistema (Pyrosequencing AB).

60 La pirosecuenciación puede realizarse según la descripción en la patente US nº 6.159.693, es decir el ácido nucleico se aísla y se amplía por RCP, los productos de la RCP ampliados se purifican y se hacen reaccionar con pirofosfato utilizando el sistema READITTM (Promega Corporation), analizando de este modo los datos obtenidos. Un programa comercial Excel que utiliza tecnología READIT (Promega Corporation) puede utilizarse para dicho análisis de los datos.

(4) Análisis del polimorfismo de la configuración monocatenaria (SSCP) por RCP

65 Además, la detección del polimorfismo génico por el procedimiento de la presente invención puede conseguirse mediante el análisis RCP-SSCP (Orita, M., Iwahara, H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 86, 2776-2770 (1989)). En

este procedimiento, los productos ampliados por RCP (ADN monocatenario) se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante, identificando de este modo la presencia o ausencia de un polimorfismo mononucleotídico basado en las diferencias de cada producto de la RCP ha migrado.

5 (5) Análisis del polimorfismo con longitud del fragmento de restricción (RFLP) por RCP

10 Para la detección de los SNP o haplotipos en genes específicos de la presente invención, cuando una secuencia de ácido nucleico que contiene un polimorfismo diana de detección contiene también un sitio de reconocimientos de la enzima de restricción, puede realizarse la detección mediante el análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de la restricción (RFLP) (Botstein, D. R. *et al.*, *Am. J. Hum. Gen.*, 32, 314-331(1980).

15 Más específicamente, el análisis RFLP puede realizarse de la forma siguiente, según el genotipo en un sitio dado en los polimorfismos génicos (a) a (p) descritos anteriormente. Tomando el genotipo en el gen (c) descrito anteriormente como ejemplo, para detectar el polimorfismo génico con el genotipo G/G en la posición 4204027 de la consecuencia genómica del gen STAT3 [STAT3-17], se realizó el análisis RFLP utilizando una enzima de restricción que reconoce no solamente el sitio del genotipo diana, sino también corriente arriba y corriente abajo de dicho sitio. Las enzimas utilizadas en el análisis RFLP pueden ser varias enzimas de restricción conocidas que pueden reconocer el sitio del genotipo diana y las secuencias corriente arriba y corriente abajo de dicho sitio. Un ejemplo específico como tal es MspI.

20 El análisis RFLP se realiza más preferentemente por el procedimiento RCP-RFLP, es decir, se amplía una muestra de ADN y se prepara por RCP o el procedimiento modificado del mismo de antemano, y se prepara la masa y la muestra de ADN concentrada se somete a análisis RFLP. De este modo, los polimorfismos génicos diana pueden detectarse en los que los sitios están escindidos específicamente.

25 Según este procedimiento de detección del polimorfismo génico, el ADN genómico se extrae en primer lugar de una muestra humana, fragmentos de ADN en una zona que contiene un sitio de polimorfismo génico de dicho gen se amplían por RCP, etc., obteniendo así muestras de gen concentradas en gran cantidad. La muestra de ADN ampliada se divide a continuación utilizando una enzima de restricción específica, y en el ADN escindido se examina (la presencia o ausencia de escisión, longitud básica de los fragmentos escindidos) siguiendo un procedimiento normalizado.

30 (6) Procedimiento invasivo

35 La detección de los SNP de genes específicos de la presente invención puede realizarse también por el procedimiento invasivo. El procedimiento invasivo puede conseguirse en referencia a los documentos siguientes:

40 Lyamichev, V. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17(3)292-296 (1999), y publicación de patente internacional WO 9823774 (publicación de patente sin examinar nº 2001-526526).

El procedimiento dado a conocer en estas publicaciones no requiere ampliación del ADN diana de antemano para analizar los SNP o el ADN genómico, y se lleva a cabo de la forma siguiente.

45 Para detectar la presencia de los SNP de genes diana específicos, por ejemplo, los genes descritos en los apartados (a), (b) y (d) a (p) el ADN genómico se aísla en primer lugar, seguido de la síntesis de sondas, utilizando, por ejemplo, un sintetizador automático. En primer lugar una sonda de oligonucleótido diana que va a sintetizarse constituida por 30 a varios cientos de bases se diseña para que presente un colgajo en 5' de 15 a 50 bases, presentan ácido nucleico (SNP en la presente invención) que debe detectarse en el lado terminal 3' de dicha solapa en 5', y ser complementaria al ADN genómico diana excluyendo el ácido nucleico del genotipo diana. Una sonda oligonucleotídica invasiva constituida por 15 o más bases se diseña para que sea complementaria al ADN genómico diana, y tienen ácido nucleico complementario con el ácido nucleico que va a detectarse en su extremo 3'. El ADN genómico aislado y una enzima que corta el colgajo en 5' de la primera sonda (solapa endonucleasa) se añaden simultáneamente a estas sondas, y se hacen reaccionar en una mezcla de reacción adecuada.

55 Cuando el ADN genómico en la muestra contiene el SNP deseado, se completa la primera reacción mediante la cual el colgajo en 5' que tiene el ácido nucleico del genotipo en su extremo 3' está separado. Cuando el ADN genómico en la muestra no contiene la secuencia de ácido nucleico del genotipo, no se produce ninguna escisión por la enzima anterior.

60 El colgajo en 5' separado de la primera sonda por escisión de la enzima se une complementariamente a una sonda de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) como diana, el extremo en 3' de el colgajo 5' invade en el interior de la sonda FRET. Asimismo, la enzima anterior produce una reacción, separando así el colorante fluorescente que se ha extinguido.

65 La sondas FRET que van a utilizarse en la segunda reacción contienen una secuencia idéntica a pesar de ser dianas que van a detectarse, y se construyen esencialmente para que comprendan los dos elementos siguientes.

(1) complemento de la región en 3' al producto separado en la primera reacción, y

(2) una región autocomplementaria que forma un doble para simular una sonda monocatenaria, y se hibrida junto con la diana, que contiene un colorante indicador fluorescente y un colorante extintor fluorescente.

Cuando el colorante indicador fluorescente anterior está unido a una sonda a la que el colorante fluorescente extintor anterior está también unido, el colorante indicador se extingue debido a la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Cuando no está acoplado a una sonda con el colorante fluorescente extintor anterior, el colorante indicador no se extingue. Por lo tanto, cuando el colgajo en 5' separado de la primera sonda por escisión se hibrida a la sonda FRET, el colgajo actúa como un invasivo-oligonucleótido en la segunda reacción, produciendo así un complejo invadido reconocido específicamente por una enzima. Por lo tanto, la escisión de las sondas FRET por la enzima específica anterior separa dos colorantes fluorescentes, y produce señales de fluorescencia detectables. Los polimorfismos que contienen los SNP deseado pueden detectarse haciendo reaccionar dichas señales de fluorescencia en un lector de placas de microvalorador fluorescente convencional. Las señales fluorescentes pueden ampliarse desde 1 hasta 10^6 veces combinando la primera y segunda reacciones. Más específicamente, el tipado por SNP puede realizarse utilizando dos sondas FRET de diferentes colorantes fluorescentes.

(7) RCP cuantitativa en tiempo real

La detección del polimorfismo génico en los genes descritos por la presente invención puede llevarse a cabo fácilmente por RCP cuantitativa en tiempo real (procedimiento TaqMan).

El procedimiento puede realizarse de la forma siguiente. Para detectar los polimorfismos génicos que contienen un SNP diana, un cebador directo y un cebador inverso, constituido cada uno por 15 a 39 bases se preparan para detectar un fragmento de ADN en una zona adecuada que contiene el polimorfismo (sitio del ácido nucleico). Sin embargo, el cebador directo y el cebador inverso, se diseñan para que no contengan el sitio del ácido nucleico diana (genotipo mononucleotídico). Una sonda, que es un oligonucleótido que presenta una secuencia de bases constituida por 15 a 50 bases con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente extintor unido a ésta, se produce a continuación. La secuencia de bases de dicha sonda puede seleccionarse de modo que la región de hibridación del cebador directo no se solape con la región de hibridación de la sonda. La sonda se diseña de modo que tenga una secuencia complementaria de la secuencia específica para un alelo para detectar la presencia o ausencia del genotipo mononucleotídico diana. Utilizando dicha sonda, un gen dado que debe detectarse en una muestra, por ejemplo, un fragmento de ADN de interés en los genes descritos en los apartados (a) a (p) mencionados anteriormente, se amplían por RCP, y el resultado fluorescente resultante de la mezcla de reacción se mide en tiempo real. El tipado del SNP se consigue de este modo. Más específicamente, la detección (tipado) del SNP puede realizarse utilizando dos sondas de diferentes colorantes fluorescentes.

Los ejemplos preferidos del colorante fluorescente indicador utilizado en el ensayo invasivo anterior y el procedimiento TaqMan incluyen los colorantes fluorescentes de tipo fluoresceína tales como FAM (6-carboxifluoresceína), y el ejemplo preferido del colorante fluorescente extintor incluyen colorantes fluorescentes de tipo rodamina tales como TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina). Estos colorantes fluorescentes son bien conocidos, y por lo tanto están incluidos en los kits de RCP comerciales en tiempo real para su utilización conveniente. Los sitios de fijación para el colorante fluorescente indicador y para el colorante fluorescente extintor no están limitados, pero por lo general el colorante fluorescente indicador se fija a un extremo (preferentemente el extremo 5') de una sonda oligonucleotídica, y el colorante fluorescente extintor se une al otro extremo. Un procedimiento para fijar un colorante fluorescente a oligonucleótidos es ya conocido, y se da a conocer en las publicaciones tales como Noble *et al.*, (1984), *Nuc. Acids Res.*, 12:3387-3403, y Lyer *et al.*, (1990), *J. Ame. Chem. Soc.*, 112:1253-1254.

El propio procedimiento TaqMan es un procedimiento conocido, y los dispositivos y kits diseñados para su utilización en el procedimiento están comercializados. En la presente invención, estos dispositivos y kits comerciales pueden asimismo utilizarse. Cuando estos dispositivos y kits comerciales se utilizan el procedimiento de la presente invención se realiza siguiendo los procedimientos dados a conocer en la patente nº 2.825.976, o en el manual del usuario para el Sistema de Detección de la Secuencia ABI PRISM 7700 preparado por PE Biosystems.

(8) Matriz de masas utilizando un espectrómetro de masas

El procedimiento de la matriz de masas detecta una diferencia de masas producida por los polimorfismos. Más específicamente, una región que contiene un polimorfismo que ha de detectarse se amplía por RCP, un cebador de ampliación se hibrida inmediatamente antes de una posición de SNP y una reacción de ampliación se realiza utilizando una mezcla de reacción que contiene la mezcla ddNTP/dNTP, por ejemplo, la mezcla de reacción que contiene ddATP, dCTP, dGTP y dTTP, produciendo de este modo fragmentos con extremos en 3' diferentes según los SNP. Estos productos se purifican y se someten al espectrómetro de masas MALDI-TOF para análisis, determinando de este modo la correlación entre la masa molecular y el genotipo (Pusch, W., Wurmbach, J. H., Thiele, H., Kostrzewa, M., MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping, *Pharmacogenomics*, 3(4):537-48

(2002)). El procedimiento puede realizarse fácilmente utilizando por ejemplo, el sistema de detección de SNP de matriz de masas de alta resolución de Sequenom.

(9) Otros procedimientos de tipado

5

El tipado de los SNP de los genes utilizados en el procedimiento de la presente invención puede realizarse también por varios procedimientos conocidos incluyendo aquellos para la secuenciación de ADN y aquellos destinados a detectar polimorfismos génicos y mutaciones genéticas. Los ejemplos de estos procedimientos se proporcionan a continuación.

10

(9-1) Tipado de SSO (oligonucleótido específico de la secuencia) por RCP

Las sondas en fase sólida correspondientes a SNP en un vehículo se hibridan para una muestra (producto génico ampliado), determinando así la diferencia de eficacia de la hibridación basada en la presencia o ausencia de desemparejamientos.

15

(9-2) Tipado RCP-SSP para detectar una mutación puntual

Utilizando un cebador específico para una secuencia destinado a la ampliación génica con un emparejamiento de bases una mutación puntual diseñada en su extremo 3', este tipado se aprovecha de una diferencia notable en la eficacia de la ampliación por RCP dependiendo de si el extremo 3' del cebador es complementario o no.

20

(9-3) Análisis RCP-DGGE (electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización)

Un ADN que contiene polimorfismo génico y un fragmento de ADN natural se mezclan para hibridación, y se someten a continuación a electroforesis en gel de poliacrilamida, en el que las concentraciones de agentes desnaturalizantes tales como urea, formamida, etc., se vuelven cada vez mayores. Los fragmentos de ADN resultantes se disocian a ADN monocatenarios en una posición en que la concentración de agentes desnaturalizantes es menor, comparada con las dobles cadenas homogéneas sin desemparejamientos. Dado que el ADN monocatenario presenta una movilidad electroforética más rápida que el ADN bicatenario, el polimorfismo de una sola base (diferencia) puede detectarse basándose en la diferencia de la velocidad de migración entre las cadenas de ADN.

25

30

(9-4) Pinza de RCP-DGGE/GC (Sheffield, V. C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 86, 232-236 (1989))

Además, del análisis RCP-DGGE anterior, este procedimiento compensa un inconveniente de la detección incompleta en caso de que se produzcan una diversidad de sustituciones, eliminaciones, adiciones o inserciones de base, acoplado una región con un alto contenido de GC a un fragmento de ADN que contiene el ácido nucleico del polimorfismo génico que debe detectarse. El procedimiento necesita una etapa de adición de una pinza GC a un fragmento de ADN que contiene un polimorfismo génico que debe detectarse.

35

40

(9-5) Ensayo de protección de RNasa (Finkelstein, J. *et al.*, *Genomics*, 7, 167-172 (1990))

(9-6) RT-RCP *in situ* (*Nucl. Acids Res.*, 21, 3159-3166 (1993))

45

(9-7) Hibridación *in situ*

(9-8) Inmunotransferencia Southern (Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning a Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989))

50

(9-9) Ensayo de hibridación de manchas (Southern, E. M. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517 (1975), etc.)

(9-10) Hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH: Takahashi, E. *et al.*, *Hum. Genet.*, 86, 1416 (1990))

55

(9-11) Hibridación genómica comparativa (CGH: Kallioneimi, A. *et al.*, *Science*, 258, 818-821 (1992)) y Spectral karyotyping (SKY: Rowley, J. D. *et al.*, *Blood*, 93, 2038-2042 (1999)).

(9-12) Procedimiento que utiliza un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC) como sonda (Lengauer, C. *et al.*, *Cancer Res.*, 52, 2590-2596 (1992)).

60

Los SNP y los haplotipos de genes humanos se detectan así mediante el procedimiento de la presente invención.

Según el procedimiento para predecir la respuesta de pacientes de cáncer de células renales a la terapia de IFN mediante la presente invención, cuando un polimorfismo de gen humano, una indicación (marcador), detectado por el procedimiento anterior se identifica en la muestra, la muestra es de esperar que sea muy sensible a la terapia de IFN (etapa iv).

65

Para los pacientes cuya respuesta a la terapia de IFN se determina que es alta, la selección de IFN se prioriza en la etapa de selección del fármaco para los cánceres de células renales debido a sus buenos efectos terapéuticos previstos. Esto conduce a la supresión de la administración de fármacos innecesaria a pacientes, con lo que los efectos secundarios producidos por los fármacos disminuyen.

En particular, los polimorfismos génicos o genotipos de los genes humanos detectados por el procedimiento según la presente invención son muy aplicables para el efecto de la terapia de IFN (efectos de supresión tumoral) en cánceres de células renales. Por lo tanto, el resultado de la detección permite la práctica de la medicina a la carta para pacientes individuales con cáncer de células renales, es decir, una terapia médica en la que los fármacos más eficaces para pacientes individuales se seleccionan de manera apropiada.

Oligonucleótidos

La presente invención proporciona además oligonucleótidos utilizados como sondas o cebadores para detectar los polimorfismos génicos en el procedimiento de evaluación (detección) de la presente invención. Dichos nucleótidos no están limitados siempre y cuando puedan ampliar específicamente una secuencia que contiene un polimorfismo génico o región de genotipo humano dado. Dichos nucleótidos pueden sintetizarse y construirse de manera adecuada según una manera convencional, basándose en la información de la secuencia de un polimorfismo génico o genotipo dado.

Más específicamente, la síntesis puede realizarse mediante síntesis químicas típicas tales como el procedimiento de las fosforoamiditas, el procedimiento de triéster fosfato, etc., utilizando un sintetizador comercial de oligonucleótidos automático, por ejemplo, Gene Assembler Plus: Pharmacia LKB, etc. Pueden obtenerse fragmentos bicatenarios sintetizando un producto monocatenario sintetizado químicamente y una cadena complementaria del mismo, e hibridándolas en condiciones apropiadas o acoplado la cadena complementaria a dicho producto monocatenario utilizando secuencias de cebador adecuadas y ADN polimerasa.

Los ejemplos preferidos de oligonucleótidos utilizados como sondas o cebadores anteriores incluyen los oligonucleótidos que emparejan parcialmente un fragmento de ADN diseñado para que contenga una secuencia de polimorfismo génico de un gen dado, y constituida por por lo menos 10, por lo general aproximadamente 10 a aproximadamente 35 bases consecutivas. Los ejemplos de un particularmente cebador incluyen dos secuencias oligonucleotídicas diseñadas y sintetizadas a fin de hacer un sándwich con SNP en una secuencia de ADN de un gen. Un fragmento de ADN que contiene una secuencia de polimorfismo génico propia puede utilizarse como sonda oligonucleotídica.

Los ejemplos preferidos de oligonucleótidos utilizados como las sondas anteriores incluyen los descritos en los apartados (a) a (p) a continuación. Entre los oligonucleótidos siguientes las sondas preferibles son aquellas con una secuencia que consta de por lo menos 15 bases consecutivas, incluyendo una región de polimorfismo de un gen dado.

(a) un oligonucleótido que presenta una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contiene un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T o T/T en la posición 4243095 del gen STAT3, y representado por el número de referencia de ID de SNP: rs1905341,

(b) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/C en la posición 4264926 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs4796793,

(c) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo G/G en la posición 4204027 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293152,

(d) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T en la posición 4050541 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293153,

(e) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/C en la posición 10246541 del gen SSI3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2280148,

(f) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/A en la posición 18686025 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1805011,

(g) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de

polimorfismo génico con genotipo A/A en la posición 17736877 del gen IRF2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2797507,

- 5 (h) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/C en la posición 17744613 del gen IRF2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs796988,
- 10 (i) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/A o C/C en la posición 390141 del gen ICSPB, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2292982,
- 15 (j) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T en la posición 26793813 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213264,
- 20 (k) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T en la posición 26794182 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213265,
- 25 (l) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo A/G en la posición 26794619 del gen PTGS1, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1213266,
- 30 (m) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo G/G en la posición 15697329 del gen PTGS2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2745557,
- 35 (n) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo G/G en la posición 23602539 del gen TAP2, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2071466,
- 40 (o) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/C en la posición 18686068 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2234898, y
- 45 (p) oligonucleótido con una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo T/T en la posición 18686553 del gen IL-4R, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1801275.

Los ejemplos específicos del oligonucleótido de la presente invención utilizados como pares de cebador mencionados anteriormente incluyen, como se describe a continuación en los ejemplos, aquellos como los cebadores directos con números de secuencia 1 al 16 y cebadores inversos con números de secuencia 17 a 32 para cada uno de los genes anteriores.

45 Kit de detección

El procedimiento de detección (evaluación de la presente invención) puede realizarse más fácilmente utilizando un kit de reactivo para la detección de un polimorfismo génico o genotipo de un gen humano dado en una muestra. La presente invención proporciona además dicho kit de reactivo.

50 Un ejemplo del kit según la presente invención comprende como componente esencial por lo menos un fragmento de ADN parcial o completamente hibridable a la secuencia de bases de un fragmento de ADN que contiene alguno de los polimorfismos génicos o genotipos anteriores de un gen humano dado o de la secuencia de base complementaria del mismo, o como componente esencial por lo menos un fragmento de ADN hibridable a una secuencia de bases que contiene una a varias bases corriente arriba de cualquiera de los sitios del polimorfismo génico específico anterior o sitios de genotipo. Otro ejemplo del kit según la presente invención comprende como componente esencial una enzima de restricción, por ejemplo, MspI, que reconoce una secuencia de varios ácidos nucleicos que incluyen cualquiera de los sitios del polimorfismo génico específico anterior o sitios de genotipo.

60 Otros componentes comprendidos en el kit de la presente invención incluyen agentes de marcado, y reactivos requeridos para realizar la RCP (por ejemplo, TaqADN polimerasa, trifosfato de desoxinucleótido, cebadores de ampliación de ADN, etc.). Los ejemplos de agentes de marcado incluyen las sustancias modificadas químicamente tales como isótopos reactivos, sustancias que emiten luz, sustancias fluorescentes, etc., y el propio fragmento de ADN puede conjugarse de antemano con un agente de marcado. Para la medición conveniente, el kit de la presente invención puede contener además diluyente de reacción adecuado, anticuerpo convencional, tampón, solución de lavado, solución de interrupción de la reacción, etc.

Ya que los polimorfismos génicos o genotipos de genes dados encontrados en el contexto de la presente invención son muy aplicables para los efectos de la terapia de IFN (efecto de supresión de tumor) en cánceres de células renales, según la presente invención, la selección adecuada de fármacos más eficaces para pacientes individuales con cánceres de células renales se hace más factible en la práctica de la medicina a la carta. La presente invención proporciona un procedimiento para detectar un polimorfismo génico o genotipo humano dado como marcador aplicable a efecto de la terapia de IFN en cánceres de células renales, es decir, el procedimiento para detectar un polimorfismo génico o genotipo dado en una muestra de un paciente con cáncer real como marcador de identificación sensible a la terapia de IFN para cánceres de células renales, un agente de diagnóstico utilizado en dicho procedimiento y un kit para diagnóstico.

Ejemplos

La presente invención se describe con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos no limitativos siguientes.

[Ejemplo 1]

(1) Muestras para análisis

Las muestras para análisis utilizadas en este ensayo son muestras de ADN genómico extraídas de muestras de sangre no rastreables, anonimizadas después de consensos de pacientes se obtuvieron en instalaciones participantes, y muestras de las que los ADN genómicos se extraen ya en las instalaciones participantes. Las muestras sin consenso y las muestras no anónimas no se utilizaron para análisis. Además, la presente información (historial del paciente, etc.) no se transmitió a los investigadores del laboratorio Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Theranostics Research Center (denominado en adelante "TRC"), colaborador.

Se disponía de 86 muestras registradas para este ensayo, de entre las cuales 76 muestras procedían de muestras de sangre, y 10 muestras estaban ya preparadas como ADN. Estas muestras se recogieron basándose en "análisis de los SNP en genes relacionados con interferón destinados a factores de predicción en investigación de efectos terapéuticos de IFN- α en cánceres de células renales (número de recepción del Comité Ético: 010724-1)", proyecto de investigación realizado por el grupo de Aplicación y Desarrollo en la aprobación del Comité Ético de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

Este proyecto se realizó en conformidad con "ETHICS GUIDELINES FOR HUMAN GENOME/GENE ANALYSIS RESEARCH, anunciado en marzo de 2001 por el Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; el Ministry of Health, Labour and Welfare; y el Ministry of Economy, Trade and Industry (primera notificación)".

Las muestras de sangre extraídas se hicieron no rastreables, anónimas en las instalaciones participantes, y se transportaron congeladas a TRC. En TRC, los ADN genómicos se extrajeron de estas muestras de sangre para utilizar como muestras para su análisis.

Las muestras de las que los ADN genómicos se habían extraído ya se hicieron también no rastreables, anónimas en las instalaciones participantes, y se transportaron congeladas a TRC para su utilización.

Todas las muestras de ADN genómico utilizadas en esta investigación se manipularon y almacenaron estrictamente en almacenamiento exclusivo (congeladas a 4°C) en un laboratorio TRC durante el periodo de investigación.

(2) Genes para análisis

Los genes para análisis utilizados en este ensayo son los grupos de genes siguientes.

(2a) Sistema receptor de IFN- α y sistema de transducción de señal

IFNAR1 (cadena α) (receptor 1 de interferón alfa), y IFNAR2 (cadena β L) (receptor 2 de interferón beta), JAK1 (Janus cinasa 1, proteína de tirosina cinasa), Tyk2, STAT1 (transductor de señal y activador de transcripción 1, 91 kDa), STAT2 (transductor de señal y activador de transcripción 2, 113 kDa), STAT3 (transductor de señal y activador de transcripción 3, factor de respuesta en fase aguda), p48 (ISGF3 γ , factor 3 de transcripción estimulada por interferón, gamma 48 kDa), SOCS-1 (supresor de señalización de citocina 1/SSI-1) (sinónimos: JAB, CIS-1, SSI-1), SOCS-2 (supresor de señalización de citocina 2/STAT12) (sinónimos: CIS-2, SSI-2, STAT12), SOCS-3 (supresor de señalización de citocina 3/SSI-3) (sinónimos: CIS-3, SSI-3), Shp-2 (sinónimos: PTPN11; proteína tirosina fosfatasa, tipo 11 de no receptor (síndrome de Noonan 1)).

(2b) Sistema Th1/Th2

STAT4 (transductor de señal y activador de transcripción 4), IL-2 (interleucina 2) IFN- γ (interferón gamma), FNT- α (factor de necrosis tumoral alfa), FNT- β (factor de necrosis tumoral beta) (LTA; linfotóxina alfa, superfamilia de FNT,

miembro 1), IL-4 (interleucina 4), receptor- α de IL-4, receptor- β de IL-4, IL-5 (interleucina 5, factor estimulante de colonias, eosinófilo), IL-6 (interleucina 6, interferón beta 2), IL-10 (interleucina 10), IL-13 (interleucina 13).

(2c) Genes cuyas expresiones se cambian supuestamente por IFN- α

5
PKR (PRKR, proteína cinasa, ARN dependiente bicatenario inducible por interferón), IRF1 (factor 1 regulador de IFN), IRF2 (factor 2 regulador de IFN), ICSPB (proteína que se fija a la secuencia de consenso de IFN), cox-1 (PTGS1; prostaglandina-endoperóxido sintasa 1, prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa), Cox-2 (PTGS2; prostaglandina-endoperóxido sintasa 2, prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa), MxA (Mx-1; miovirus (virus de la gripe) resistencia 1, proteína p78 e inducible por el interferón (ratón)).

(2d) Otros genes

15
TAP1 (transportador 1, casete de fijación al ATP, subfamilia B (MDR/TAP)), TAP-2 (transportador 2, casete de fijación al ATP, subfamilia B (MDR/TAP)), LMP7 (PSM β 8; subunidad de proteasoma (prosome, macropain), tipo β , 8 (proteasa 7 multifuncional grande), CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), GSTT1 (glutación S-transferasa theta 1), VHL, HIF-1 α , HLF, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

(3) Los SNP para análisis

20
Entre los grupos de genes anteriores, los SNP registrados en los dbSNP de NCBI al comienzo del ensayo se compararon con las secuencias génicas registradas para análisis en la sala de Bioinformática (denominada en adelante "sala BI") de Otsaka Pharmaceutical Co., Ltd. Como resultado de esta comparación, para el análisis de este ensayo se utilizaron los cartografiados próximos a la secuencia registrada, pero los que no se cartografiaron próximos a éstas se excluyeron de los análisis. El número final de SNP para análisis fue de 1167.

(4) Procedimientos del ensayo

(4a) Extracción del ADN genómico

30
La extracción del ADN genómico se realizó utilizando un kit para extracción del genoma a partir de la sangre completa (PUREGENETM, Gentra Systems, Inc.). Los procedimientos de extracción siguieron el protocolo habitual acompañado con PUREGENETM. El ADN genómico extraído se lisó en una solución de lisis incluida en el kit, y se midió la absorbancia para calcular la cantidad completa extraída.

(4b) RCP (para ensayo invasivo)

40
Las regiones genómicas que contienen los SNP para análisis se ampliaron por RCP. Se utilizó ExTaqTM (TaKaRa) como ADN polimerasa, y el tampón 10 x Ex Taq acompañante se utilizó como tampón de reacción.

Se realizó la reacción en las condiciones siguientes.

Cantidad de plantilla (ADN genómico): 1 a 10 ng

45
Concentración de cebador: 0,1 a 0,2 μ M

Volumen total de la mezcla de reacción: 15 μ l

50
Ciclo de RCP: (1) 95°C x 2 min., (2) 95°C x 30 s., (3) 50 a 64°C x 30 s., (4) 72°C x 1,5 min., (5) (2) a (4) x 50 ciclos y (6) mantenido a 15°C

Se utilizaron los productos de la RCP como plantillas de reacción para el ensayo invasivo a continuación.

55
Las secuencias de ácidos nucleicos de los cebadores directos en la reacción anterior se muestran como representados por los números de secuencia 1 a 16, y las secuencias de ácido nucleico de cebadores inversos se muestran como representados por los números de secuencia 17 a 32. La Tabla 2 muestra la relación entre los cebadores, genomas de gen humano dados y los SNP contenidos en éstos.

Tabla 2

Gen	SNP (rs nº)	SNP (TRC nº)	Tamaño del producto (pb)	Cebador L	Cebador R	RFLP	Enzima de restricción (secuencia reconocida)
STAT3	Rs1905341	STAT3-2	470	Sec. nº 1	Sec. nº 17	X	
	Rs4796793	STAT3-3	806	Sec. nº 2	Sec. nº 18	X	
	Rs2293152	STAT3-17	461	Sec. nº 3	Sec. nº 19	RFLP	Msp I (TGCSGGA)
	Rs2293153	STAT3-18	276	Sec. nº 4	Sec. nº 20	X	
SSI3	Rs2280148	SSI3-1	456	Sec. nº 5	Sec. nº 21	X	
IL-4R	Rs1805011	IL4R-22	378	Sec. nº 6	Sec. nº 22	X	
IRF2	Rs2797507	IRF2-67	382	Sec. nº 7	Sec. nº 23	X	
	Rs796988	IRF2-82	434	Sec. nº 8	Sec. nº 24	X	
ICSPB	Rs2292982	ICSPB-38	427	Sec. nº 9	Sec. nº 25	X	
PTGS1	Rs1213264	PTGS1-3	476	Sec. nº 10	Sec. nº 26	X	
	Rs1213265	PTGS1-4	436	Sec. nº 11	Sec. nº 27	X	
	Rs1213266	PTGS1-5	411	Sec. nº 12	Sec. nº 28	X	
PTGS2	Rs2745557	PTGS2-12	486	Sec. nº 13	Sec. nº 29	X	
TAP2	Rs2071466	TAP2-5	475	Sec. nº 14	Sec. nº 30	X	
IL-4R	Rs2234898	IL4R-14	432	Sec. nº 15	Sec. nº 31	X	
	Rs1801275	IL4R-29	491	Sec. nº 16	Sec. nº 32	X	

5 (5) Ensayo invasivo

Los productos de la RCP que contienen regiones de SNP ampliadas se diluyeron 10 a 1000 veces en agua destilada, los productos de la RCP diluidos se desnaturalizaron para obtener los ADN monocatenarios calentando a 95°C durante 5 minutos, seguidos de enfriamiento inmediato en hielo. Los ADN resultantes, utilizados como plantillas de la reacción se mezclaron con un reactivo para el ensayo invasivo para preparar mezclas de reacción. Las composiciones de las mezclas de reacción estaban de acuerdo con el protocolo 384-WELL REACTION FORMAT adjunto.

Se incubaron las mezclas de reacción a 63°C durante 30 a 60 minutos, y reaccionaron una enzima. Después de la reacción, se utilizaron dos longitudes de onda (roja y verde), luz de excitación 485 ± 6 nm, luz emitida 530 ± 6 nm (colorante FAM) y luz de excitación 560 ± 6 nm, luz emitida 620 ± 6 nm, para medir las intensidades de fluorescencia, utilizando el lector de microplacas de fluorescencia, Safire (TECAN).

Todos los procedimientos de tipado, excepto la dilución, se realizaron utilizando un sistema de tipado automático de SNP basado en Biomek FX/SAMI (Beckman Coulter).

Los resultados de la medición de las intensidades de la fluorescencia se introdujeron en el BARCODE LAB SYSTEM, versión 1.0 equipado con la correlación de tipado automático (BLABS™, Mitsui Knowledge Industry Co., Ltd.) y la genotipia de SNP se determinó por tipado automático. Los resultados del tipado se identificaron de nuevo utilizando un diagrama de dispersión por los investigadores.

(6) RCP-RFLP

Los SNP que podrían no ser tipados por el ensayo invasivo se tiparon por RCP-RFLP. En este procedimiento, los SNP se tipan basándose en la escisión de una región que contiene SNP mediante una enzima de restricción. Cuando una región SNP no contenía un sitio adecuado reconocible por la enzima de restricción, se formó un sitio reconocible de enzima de restricción diseñando cebadores de ampliación próximos al SNP, y cambiando a propósito las secuencias de los cebadores.

En este procedimiento la enzima de restricción NspI se utilizó para detectar los SNP en STAT3-17.

Se realizó la RCP utilizando tampón de Vogelstein, y otras condiciones fueron las siguientes.

Cantidad de plantilla (ADN genómico): 5 ng

Concentración de cebador: 0,1 a 0,2 µM

Volumen total de la mezcla de reacción: 15 µl

Ciclo de RCP: (i) 95°C x 2 min., (ii) 95°C x 30 s., (iii) 50 a 60°C x 30 s., (iv) 72°C x 1 min., (v) etapas (ii) a (iv) x 35 a 45 ciclos y (vi) mantenida a 15°C

Los productos de la RCP se trataron con enzimas de restricción, se sometieron a electroforesis utilizando gel de agarosa al 4% para analizar las longitudes del fragmento del producto escindido para el tipado.

(7) Genotipado

Se determinó el genotipo basándose en las intensidades de fluorescencia de dos colores detectados como resultado de la reacción del ensayo invasivo descrita en el apartado (5) anterior. 463 SNP en 33 genes se tiparon de este modo para los genotipos de pacientes por el ensayo invasivo. Además, 26 SNP en 13 genes se tiparon igualmente para los genotipos por RCP-RFLP descritos en el apartado (6) anterior.

(8) Resultado 1 (búsqueda útil de investigación de los SNP para identificar grupos CR+PR y el grupo PD)

En 86 casos acumulados, se evaluaron 3 casos como no sensibles, 8 casos no presentaron ningún foco metastásico y 24 casos tenían evaluación invariable de la respuesta (grupo NC = sin cambio en el grupo) (incluyendo un caso sin foco metastásico). Excluyendo estos 34 casos, los 52 casos restantes se utilizaron para análisis. Eran el grupo CR (grupo de respuesta completo), grupo PR (grupo de respuesta parcial) y grupo PD (grupo de enfermedad progresiva). La evaluación de estas respuestas al tratamiento estaban de acuerdo con las General Rules for Renal Carcinoma, abril de 1999, 3ª edición. Las reglas pueden ser referidas además a las siguientes: "Guidelines to Evaluate the response to Chemoterapy in Solid Tumors" (*J. Jpn. Soc. Cancer Ther.*, 21(5):929-924, Junio de 1986), publicada por la Japan Society of Clinical Oncology.

Para las 463 SNP que deben analizarse en cuanto a si pueden ser factores de identificación o no para estos casos, la capacidad de identificación de cada SNP se analizó por un análisis estadístico discriminante. Los SNP con un nivel de significación que es $p > 0,1$ en términos de la prueba de la ji cuadrada de Pearson se supusieron que tienen baja capacidad de identificación y por lo tanto están excluidos del análisis.

De este modo, se excluyeron 445 SNP de las 463 SNP, dejando 18 SNP como candidatos. Además, cuando existe una diversidad de variables fuertemente correlacionadas entre sí, solamente una variable entre éstas necesita examinarse su capacidad de identificación debido a las características del análisis multivariado. Por esta razón, los SNP muy correlacionados entre sí, se investigaron utilizando la estadística V de Cramer (L. D. Fisher y G. V. Belle, *Biostatistics, A Methodology for the Health Sciences*, 278, 1993, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York) antes de realizar el análisis de regresión logística, reduciendo los números de los SNP que deben analizarse de 18 a 16.

Los SNP finales salidos como resultado del análisis anterior se supuso que tienen capacidad de identificación después de ajustar las influencias por los factores de fondo en relación con la supresión tumoral, utilizando un modelo de regresión logística paso a paso (L. D. Fisher y G. V. Belle, *Biostatistics, A Methodology for the Health Sciences*, 638-647, 1993, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Los factores de fondo ajustados fueron el sexo, la edad, los descubrimientos histológicos (tipo de célula, grado, pT, pM, insipencia y recurrencia, metástasis pulmonar, metástasis del hígado, metástasis cerebral, metástasis ósea, metástasis de ganglios linfáticos). El nivel de significación utilizado fue 0,05.

Los resultados se presentan en la Tabla 3 y Tabla 4.

Tabla 3

	Total	Grupos NC + PD		Grupos CR + PR		Prueba de la χ^2 Valor P	
		N	%	N	%		
STAT1-18	AA	73	46	63,01	27	36,99	0,0710
	AG	2	0	0,00	2	100,00	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-2	CC	22	18	81,82	4	18,18	0,0094
	CT	42	25	59,52	17	40,48	
	TT	11	3	27,27	8	72,73	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-3	GG	25	21	84,00	4	16,00	0,0033
	GC	47	30	63,83	17	36,17	
	CC	11	3	27,27	8	72,73	
	Total	83	54	65,06	29	34,94	
STAT3-18	CT	9	3	33,33	6	66,67	0,0660
	TT	66	43	65,15	23	34,85	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	

Tabla 3 (continuación)

		Total	Grupos NC + PD		Grupos CR + PR		Prueba de la χ^2
			N	%	N	%	Valor P
STAT3-21	AA	12	4	33,33	8	66,67	0,0184
	AG	41	24	58,54	17	41,46	
	GG	22	18	81,82	4	18,18	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-25	CC	12	4	33,33	8	66,67	0,0184
	CT	41	24	58,54	17	41,46	
	TT	22	18	81,82	4	18,18	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-31	CT	10	3	30,00	7	70,00	0,0288
	TT	65	43	61,33	22	33,85	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-52	AA	12	4	33,33	8	66,67	0,0184
	AC	41	24	58,54	17	41,46	
	CC	22	18	81,82	4	18,18	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-17	CC	8	7	87,50	1	12,50	0,0346
	CG	36	25	69,44	11	30,56	
	GG	31	14	45,16	17	54,84	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
SSI3-1	AA	52	37	71,15	15	28,85	0,0183
	AC	20	7	35,00	13	65,00	
	CC	3	2	66,67	1	33,33	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	

Tabla 4

5

		Total	Grupos NC + PD		Grupos CR + PR		Prueba de la χ^2
			N	%	N	%	Valor P
IL4R-14	AC	9	8	88,89	1	11,11	0,0704
	CC	66	38	57,58	28	42,42	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
IL4R-29	CT	17	14	82,35	3	17,65	0,0430
	TT	58	32	55,17	26	44,83	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
IL4R-22	AA	61	34	55,74	27	44,26	0,0378
	AC	14	12	85,71	2	14,29	
	Total	75	46	61,33	29	34,94	
IRF2-82	CC	11	4	36,36	7	63,64	0,0572
	CT	23	7	30,43	16	69,57	
	TT	18	12	66,67	6	33,33	
	Total	52	23	44,23	29	38,67	
IRF2-67	AA	6	1	16,67	5	83,33	0,0547
	AC	31	20	64,52	11	35,48	
	CC	37	25	6,57	12	32,43	
	Total	74	46	62,16	28	37,84	
ICSPB-38	AA	36	20	55,56	16	44,44	0,0833
	AC	32	19	59,38	13	40,63	
	CC	37	7	100,00	0	0,00	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
PTGS1-3	CC	70	45	64,29	25	35,71	0,0495
	CT	5	1	20,00	4	80,00	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
PTGS1-4	CT	7	1	14,29	6	85,71	0,0073
	TT	68	45	66,18	23	33,82	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
PTGS1-5	AG	9	2	22,22	7	77,78	0,0102
	GG	66	44	66,67	22	33,33	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	

Tabla 4 (continuación)

		Total	Grupos NC + PD		Grupos CR + PR		Prueba de la χ^2
			N	%	N	%	Valor P
PTGS2-12	AG	9	8	88,89	1	11,11	0,0704
	GG	66	38	57,58	28	42,42	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
TAP2-5	AA	3	3	100,00	0	0,0	0,0717
	AG	18	14	77,78	4	22,22	
	GG	54	29	53,70	25	46,30	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	

5 Dado que el único factor de fondo determinado que es adecuado para evaluar por análisis de regresión logística era la presencia o ausencia de la metástasis pulmonar, se incorporó a la fuerza en un modelo, con lo cual el análisis de regresión logística paso a paso se adoptó para analizar los 13 SNP. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Etapa 0. Metástasis pulmonar introducida				Etapa 1. Metástasis pulmonar e IL4R-29 combinada			
Efecto	DF	Wald χ^2	Pr > χ^2	Efecto	DF	Wald χ^2	Pr > χ^2
Metástasis pulmonar	1	5,7899	0,0161	Metástasis pulmonar	1	5,0697	0,0243
		Score		IL4R-29	1	5,0220	0,0250
Efecto	DF	χ^2	Pr > χ^2	Efecto	DF	χ^2	Pr > χ^2
STAT3-2	2	7,3400	0,0255	STAT3-2	2	6,2350	0,0443
IL4R-14	1	1,9023	0,1678	IL4R-14	1	0,0069	0,9337
IL4R-29	1	5,6613	0,0173	IL4R-22	1	1,7277	0,1887
IL4R-22	1	5,3691	0,0205	IRF2-67	2	3,4973	0,1740
IRF2-67	2	3,1816	0,2038	IRF2-82	2	7,2690	0,0264
IRF2-82	2	6,4242	0,0403	PTGS1-4	1	1,4449	0,2294
PTGS1-4	1	1,6800	0,1949	PTGS1-5	1	2,9970	0,0834
PTGS1-5	1	2,3196	0,1278	TAP2-5	2	9,7880	0,0075
TAP2-5	2	7,6356	0,0220				

10 En la Tabla 5, los apartados bajo "Efecto" son los SNP que se ensayaron. "DF" significa grado de libertad.

15 Ji al cuadrado de Wald significa la prueba estadística de la ji cuadrada de Wald y ji cuadrada de Score significa la prueba estadística de la ji cuadrada (χ^2) de Score, Pr > ji cuadrada el valor P de la prueba de ji cuadrada de Wald o la prueba de la ji cuadrada de Score.

20 Como se muestra en la Tabla 5, la etapa 0 indica las capacidades de identificación de los SNP después de ajustar la influencia por la presencia de la metástasis pulmonar. Los SNP con valor P inferior a 0,05 están identificados como útiles para la identificación aun después de ajustar la influencia por la presencia de la metástasis pulmonar.

25 Los resultados pusieron de manifiesto que los SNP hallados útiles para la identificación son STAT3-2, IL-4R-29, IL-4R-22, IRF2-82 y TAP2-5. IL-4R-29, que se identificó como que tiene la capacidad de identificación mayor entre estos seis SNP, se incorporó en el modelo de análisis de regresión logística (ajuste de la metástasis pulmonar).

30 Los valores P en la etapa 1 de la Tabla 5 muestran las capacidades de identificación de los SNP restantes cuando la presencia o ausencia de la metástasis pulmonar e IL-4R-29 se combinaron. Los SNP con valores P inferiores a 0,05 se sugirió que tienen información de identificación independiente de IL-4R-29. Dichos SNP eran STAT3-2, IRF2-82 y TAP2-5. La combinación de IL-4R-29 y TAP2-5 se sugirió que tiene la mayor capacidad de identificación después de ajustar la influencia por la presencia o ausencia de la metástasis pulmonar. Cuando se combinan con IL-4R-29 en esta etapa, ningún SNP llegó a ser nuevamente significativo.

35 A partir de los resultados mostrados en la Tabla 5, los SNP que se sugirió que son marcadores de identificación para los pacientes con cánceres de células renales con la supresión tumoral esperada del foco primario y del foco metastásico son STAT3-2, IRF2-82, IL-4R-22 y TAP2-5 que llegó a ser significativo en la etapa 0, además de IL-4R-29, el mejor candidato.

La incorporación de esta clasificación de etapas en el modelo evitó la disminución de la detección estadística causada por factores de fondo no uniformes de pacientes, se ajustaron dichos factores de fondo no uniformes de los pacientes entre los dos grupos, y se confirmaron las diferencias del valor de significación entre los dos grupos.

[Ejemplo 2] Búsqueda útil de investigación de los SNP para identificar grupos CR+PR y grupos NC+PD

5 Utilizando las muestras de los pacientes descritas en el ejemplo 1, los casos en los que se añadió el grupo NC al grupo PD se analizaron para los polimorfismos génicos dados en relación con los efectos terapéuticos de IFN en cánceres de células renales.

10 Las razones para el tamaño inalterado de los tumores en el grupo NC se supuso que era porque los tumores no respondían a IFN, o los tumores respondían a IFN pero crecían demasiado poco de tamaño y su aspecto no presentaba ningún cambio. La evaluación de la respuesta a IFN dependía de qué razón se considerara, pero en este ejemplo el grupo NC se consideró un grupo no sensible debido al tamaño invariable de los tumores. Basándose en esta consideración, se añadió el grupo NC al grupo PD tal como se describió anteriormente para realizar el tipado del polimorfismo génico.

15 De entre los 86 casos recogidos, se evaluaron 3 casos como insensibles, mientras que 8 casos no presentaban ningún foco de metástasis. Estos 11 casos se eliminaron, dejando 75 casos para análisis.

20 De la misma manera que en el ejemplo 1, las capacidades de identificación individuales de los 463 SNP se analizaron por un análisis estadístico discriminante y se supuso que los SNP tenían poca capacidad de identificación se excluyeron de los candidatos para el análisis. Como resultado de este cribado, se excluyeron 441 SNP de los 463 SNP, dejando 23 SNP como candidatos.

25 Además, se investigaron las combinaciones de los SNP que se correlacionan fuertemente entre sí utilizando V de Cramer antes de realizar el análisis de regresión logística, reduciendo las cifras de los SNP que han de analizarse de 23 a 17.

Se evaluaron las capacidades de identificación de los 17 SNP finales utilizando el modelo de regresión logística paso a paso después de ajustar la influencia por los factores de fondo aplicables a la supresión tumoral.

30 El factor de fondo ajustado era solamente la metástasis pulmonar, que se estableció relacionada posiblemente con la supresión tumoral en el ejemplo 1 anterior. El nivel de significación fue de 0,05. Las Tablas 6 y 7 muestran los resultados del análisis de los 23 SNP con un nivel de significación de $p \leq 0,1$ como capacidad de identificación de SNP individual.

35

Tabla 6

		Total	Grupos NC+PD		Grupos CR+PR		Prueba de la χ^2 Valor P
			N	%	N	%	
STAT1-18	AA	73	46	63,01	27	36,99	0,0710
	AG	2	0	0,00	2	100,00	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-2	CC	22	18	81,82	4	18,18	0,0094
	CT	42	25	59,52	17	40,48	
	TT	11	3	27,27	8	72,73	
Total	75	46	61,33	29	38,67		
STAT3-18	CT	9	3	33,33	6	66,67	0,0660
	TT	66	43	65,15	23	34,85	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-21	AA	12	4	33,33	8	66,67	0,0184
	AG	41	24	58,54	17	41,46	
	GG	22	18	81,82	4	18,18	
Total	75	46	61,33	29	38,67		
STAT3-25	CC	12	4	33,33	8	66,67	0,0184
	CT	41	24	58,54	17	41,46	
	TT	22	18	81,82	4	18,18	
Total	75	46	61,33	29	38,67		
STAT3-31	CT	10	3	30,00	7	70,00	0,0288
	TT	65	43	66,15	22	33,85	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
STAT3-52	AA	12	4	33,33	8	66,67	0,0184
	AC	41	24	58,54	17	41,46	
	CC	22	18	81,82	4	18,18	
Total	75	46	61,33	29	38,67		

Tabla 6 (continuación)

		Total	Grupos NC+PD		Grupos CR+PR		Prueba de la χ^2 Valor P
			N	%	N	%	
STAT3-17	CC	8	7	87,50	1	12,50	0,0346
	CG	36	25	69,44	11	30,56	
	GG	31	14	45,16	17	54,84	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
SSI3-1	AA	52	37	71,15	15	28,85	0,0183
	AC	20	7	35,00	13	65,00	
	CC	3	2	66,67	1	33,33	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
IL4R-14	AC	9	8	88,89	1	11,11	0,0704
	CC	66	38	57,58	28	42,42	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	

Tabla 7

5

		Total	Grupos NC + PD		Grupos CR + PR		Prueba de la χ^2 Valor P
			N	%	N	%	
IL4R-29	CT	17	14	82,35	3	17,65	0,0430
	TT	58	32	55,17	26	44,83	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
IL4R-22	AA	61	34	55,74	27	44,26	0,0378
	AC	14	12	85,71	2	14,29	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
IRF2-8	CC	41	26	63,41	15	36,59	0,0601
	CG	28	19	67,86	9	32,14	
	TT	6	1	16,67	5	83,33	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
IRF2-67	AA	6	1	16,67	5	83,33	0,0547
	AC	31	20	64,52	11	35,48	
	CC	37	25	67,57	12	32,43	
	Total	74	46	62,16	28	37,84	
ICSPB-38	AA	36	20	55,56	16	44,44	0,0833
	AC	32	19	59,38	13	40,63	
	CC	7	7	100,00	0	0,00	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
PTGS1-3	CC	70	45	64,29	25	35,71	0,0495
	CT	5	1	20,00	4	80,00	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
PTGS1-4	CT	7	1	14,29	6	85,71	0,0073
	TT	68	45	66,18	23	33,82	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
PTGS1-5	AG	9	2	22,22	7	77,78	0,0102
	GG	66	44	66,67	22	33,33	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
PTGS2-12	AG	9	8	88,89	1	11,11	0,0704
	GG	66	38	57,58	28	42,42	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	
TAP2-5	AA	3	3	100,00	0	0,0	0,0717
	AG	18	14	77,78	4	22,22	
	GG	54	29	53,70	25	46,30	
	Total	75	46	61,33	29	38,67	

10

Se obtuvieron los valores V de Cramer, que indican el grado de correlación entre los 23 SNP, y los resultados pusieron de manifiesto que las capacidades de identificación de STAT3-2, STAT3-21, STAT3-25 y STAT3-52 se consideraron aproximadamente idénticas. Asimismo, las capacidades de identificación de STAT3-18 y STAT3-31 fueron iguales, y las de IL-4R-14, IL-4R-18 e IL-4R-16 eran también iguales. En consecuencia, STAT3-2, STAT3-18 e IL-4R-14 se utilizaron en un análisis multivariante como representativas de cada grupo. Como resultado, 17 SNP se dejaron para análisis.

15

De los 75 casos en los que se verificó la presencia o ausencia de metástasis pulmonar, 2 casos con datos analíticos de SNP desaparecidos en parte, dejando 73 casos como candidatos finales para el análisis.

De entre los 75 casos en los que se verificó la presencia o ausencia de metástasis pulmonar, se excluyeron 2 casos con datos analíticos de SNP parcialmente desaparecidos, dejando 73 casos como candidatos finales para análisis.

- 5 La presencia o ausencia de metástasis pulmonar se introdujo a la fuerza en el modelo, y se sometieron 17 SNP a análisis de regresión logística paso a paso. Los resultados se presentan en la Tabla 8 a continuación de la misma manera que en la Tabla 5 anterior.

La etapa 0 en la Tabla 8 presenta las capacidades de identificación de los SNP después de ajustar la influencia por la presencia o ausencia de metástasis pulmonar. Los SNP con valores P inferiores a 0,05 se indicaron como adecuados para la identificación incluso después de ajustar la influencia por la presencia o ausencia de metástasis pulmonar. Los SNP que se observó que eran adecuados para la identificación eran STAT3-2, STAT3-17, SSI3-1, IL-4R-22, PTGS1-4 y PTGS1-5. STAT3-2, que presentaba la mayor capacidad de identificación entre estos 6 SNP, se incorporó en el modelo.

Los valores P en la etapa 1 indican las capacidades de identificación de cada uno de los SNP restantes cuando la presencia o ausencia de metástasis pulmonar se combinaba con STAT3-2. Los SNP con valores P inferiores a 0,05 se sugirió que tenían información de identificación independiente del STAT3-2. Dichos SNP eran SSI3-1, IL-4R-22, ICSPB-38, PTGS1-3, PTGS1-4, PTGS1-5, PTGS2-12 y TAP2-5. Entre éstos, la combinación de STAT3-2 y PTGS1-4 se sugirió que tenía capacidad de identificación mayor después de ajustar la influencia por la presencia o ausencia de metástasis pulmonar. Los SNP que se sugirió que son útiles durante el primer periodo cuando se combinan con STAT3-2 fueron ICSPB-38, PTGS1-3, PTGS2-12 y TAP2-5.

La etapa 2 muestra las capacidades de identificación de cada uno de los SNP restantes cuando la presencia o ausencia de metástasis pulmonar se combinó con STAT3-2 y PRGS1-4. Se sugirió que las variables que tienen información dependiente de STAT3-2 y PTGS1-4 y que son útiles cuando se combinan con éstos eran IL-4R-22, IRF2-67 e ICSPB-38. Se sugirió que IRF2-67 es un SNP útil para identificación durante el primer período en esta etapa.

En conclusión, de los resultados presentados en la Tabla 8, se sugirió que los SNP que son marcadores de identificación para los pacientes con cánceres de células renales con supresión tumoral esperada de foco primario y de foco de metástasis son, además de STAT3-2, el mejor candidato, STAT3-17, SSI3-1, IL-4R-22, PTGS1-4 y PTGS1-5 que resultan significativos en la etapa 0; ICSPB-38, PTGS1-3, PTGS2-12 y TAP2-5 que resulta nuevamente significativo en la etapa 1; e IRF2-67 que resulta nuevamente significativo en la etapa 2.

Los resultados del análisis en los ejemplos 1 y 2 pudieron de manifiesto que STAT3-2, IL-4R-29, IL-4R-14, IL-4R-22, IRF2-82 y TAP2-5 eran polimorfismos génicos aplicables para el efecto terapéutico de IFN (efecto de supresión tumoral) en el cáncer de células renales en comparación entre los grupos CR+PR y el grupo PD, y que TAP2-5, STAT3-17, SSI3-1, IL-4R-22, PTGS1-4, PTGS1-5, ICSPB-38, PTGS1-3, PTGS2-12 y TAP2-5, e IRF2-67. Se consideraron también como tales en la comparación entre los grupos CR+PR y los grupos NC+PD.

En la comparación entre los grupos CR+PR y el grupo PD, STAT3-2 se indicó que tiene la capacidad de identificación mayor, y la comparación entre los grupos CR+PR y los grupos NC+PD, IL-4R-29 se indicó que tiene la mayor capacidad de identificación.

En un experimento independiente, se observó que STAT3-3 estaba asimismo asociado a STAT3-18.

Según los resultados obtenidos anteriormente, la presente invención puede proporcionar así un procedimiento para predecir la respuesta a la terapia del interferón de un paciente con cáncer de células renales, preparando como polimorfismos génicos aplicables para la eficacia terapéutica de IFN (efecto de supresión tumoral) en el cáncer de células renales, una secuencia genómica o una cadena complementaria del mismo procedente de una muestra del paciente con cáncer de células renales, determinando la secuencia del ADN genómico o una secuencia de ADN complementario del mismo, utilizando como marcador de identificación para la presencia de un polimorfismo génico o genotipo de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por STAT3-2, STAT3-3, STAT3-17, STAT3-18, SSI3-1, IL-4R-22, IRF2-67, IRF2-82, ICSPB-38, PTGS1-3, PTGS1-4, PTGS1-5, PTGS2-12, TAP2-5, IL-4R-14, IL-4R-29 y IRF2-67.

50 **Aplicabilidad industrial**

Según la presente invención, la presencia de un polimorfismo génico aplicable para el efecto de la terapia de IFN (efecto de supresión tumoral) en cáncer de células renales se detecta, con lo que el polimorfismo detectado, como indicación, puede utilizarse provechosamente como un marcador de identificación sensible a la terapia de IFN para el cáncer de células renales.

60 **Listado de secuencias sin texto**

Números de secuencias: 1 a 32 muestran las secuencias de cebador.

65 **Listado de secuencias**

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

65 <120> Marcador para identificar el efecto del tratamiento de interferón en el carcinoma de células renales

<130> P05-117
 <150> JP 2004-314160
 <151> 2004-10-28
 5 <160> 32
 <170> PatentIn versión 3.1
 10 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de cebador (directo) para STAT3-2
 <400> 1
 20 gagagtggga ggaggagag 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador (directo) para STAT3-3
 30 <400> 2
 gcagccagtg gaagaatagg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de cebador (directo) para STAT3-17
 <400> 3
 45 ggctgaagt gacttttg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia de cebador (directo) para STAT3-18
 <400> 4
 55 gttacaaggc tgaaggctgc 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador (directo) para SSI3-1
 65 <400> 5

	tccactgtg gttgctatcg	20
5	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia de cebador (directo) para IL-4R-22 <400> 6	
15	tgcaagtcag gttgtctgga	20
20	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia de cebador (directo) para IRF2-67 <400> 7	
30	actgatgaac cggttgctt	20
35	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia de cebador (directo) para IRF2-82 <400> 8	
45	tgaagaaaag ggggtggag	20
50	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia de cebador (directo) para ICSPB-38 <400> 9	
60	ggtttgat tacggctgt	20
65	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia de cebador (directo) para PTGS1-3 <400> 10	
	tccaggactg agcgtgacta	20
	<210> 11 <211> 20 <212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (directo) para PTGS1-4	
5	<400> 11	
	atcccatgaa gggggttag	20
10	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (directo) para PTGS1-5	
	<400> 12	
20	gaagggatgg aaagggagag	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (directo) para PTGS2-12	
30	<400> 13	
	tcagacagca aagcctacc	20
	<210> 14	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia de cebador (directo) para TAP2-5	
	<400> 14	
	ggtaggagg taggaggcag	20
45	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (directo) para IL-4R-14	
	<400> 15	
55	ctctctggga cacggtgact	20
	<210> 16	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (directo) para IL-4R-29	
65	<400> 16	

	tgctcctac ctttcccc	20
5	<210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para STAT3-2	
	<400> 17	
15	tcccaaagtg acaggtttt g	21
	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para STAT3-3	
	<400> 18	
25	cacatggttc cccagatacc	20
	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para STAT3-17	
	<400> 19	
35	aggcttcctt ttgtccgtt	20
40	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para STAT3-18	
	<400> 20	
50	accgtcccct acaatgtctg	20
	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para SSI3-1	
	<400> 21	
60	attacatcta ctccgggggc	20
	<210> 22 <211> 20 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia de cebador (inverso) para IL-4R-22	
	<400> 22	
	tgcgatgtgt ggagttggtt	20
10	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (inverso) para IRF2-67	
	<400> 23	
20	gtagcctcca tctgtgcat	20
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (inverso) para IRF2-82	
30	<400> 24	
	gtcaatgttt ggcggagttc	20
	<210> 25	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia de cebador (inverso) para ICSPB-38	
	<400> 25	
45	ttgggaaagg cacagaattt	20
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (inverso) para PTGS1-3	
	<400> 26	
55	ggacttgact cagtgccat	20
	<210> 27	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de cebador (inverso) para PTGS1-4	
65	<400> 27	

	aatcttcgag cctgacacct	20
5	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para PTGS1-5 <400> 28	
15	ggagggactc acccaagaat	20
20	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para PTGS2-12 <400> 29	
30	tgggagcagg aaagaactga	20
35	<210> 30 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para TAP2-5 <400> 30	
45	ttttcatgcc tcttcaggt g	21
50	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para IL-4R-14 <400> 31	
60	gtggagtgtg aggaggagga	20
65	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia de cebador (inverso) para IL-4R-29 <400> 32	
75	agtagaaccc gagatgcct	20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral mediante la terapia con IFN de un paciente con cáncer de células renales, comprendiendo dicho procedimiento las etapas (i) a (iii) siguientes;
- 5 (i) una etapa de preparación de un ADN genómico o de una cadena complementaria del mismo de por lo menos el gen STAT3 utilizando la muestra de ADN obtenida de un paciente con cáncer de células renales,
- 10 (ii) una etapa de análisis de la secuencia de ADN del ADN genómico o de la cadena complementaria del mismo, y determinación de su polimorfismo génico, y
- 15 (iii) una etapa de evaluación de la supresión tumoral por terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales, utilizando como marcador por lo menos un polimorfismo génico determinado en la etapa (ii) anterior, siendo el polimorfismo génico un polimorfismo de por lo menos el gen STAT3.
2. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral por terapia con IFN en un paciente con un cáncer de células renales según la reivindicación 1, en el que el polimorfismo génico es por lo menos uno seleccionado de entre el grupo constituido por (a) a (d) a continuación:
- 20 (a) polimorfismo génico (STAT3-2) con genotipo C/T o T/T en la posición 4243095 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1905341,
- 25 (b) polimorfismo génico (STAT3-3) con genotipo C/C en la posición 4264926 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs4796793,
- 30 (c) polimorfismo génico (STAT3-17) con genotipo G/G en la posición 4204027 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293152,
- (d) polimorfismo génico (STAT3-18) con genotipo C/T en la posición 4050541 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293153.
3. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral mediante terapia con IFN en un paciente con cáncer de células renales según la reivindicación 2, en el que el polimorfismo génico es el de (a) de la reivindicación 2.
- 35 4. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral por terapia con IFN en un paciente con un cáncer de células renales según la reivindicación 1, en el que el IFN se selecciona de entre el grupo constituido por IFN- α , IFN- α recombinante e IFN- γ recombinante.
- 40 5. Procedimiento para evaluar la supresión tumoral por terapia con IFN en un paciente con un cáncer de células renales según la reivindicación 1, en el que el polimorfismo génico es determinado por por lo menos un procedimiento seleccionado de entre el grupo constituido por secuenciación directa, análisis de hibridación de transferencia puntiforme de oligonucleótido específico del alelo (ASO), ampliación del cebador mononucleotídico, análisis del polimorfismo de configuración monocatenario (SSCP) por RCP, análisis del polimorfismo con longitud del fragmento de restricción (RFLP) por RCP, procedimiento invasivo, RCP cuantitativa en tiempo real y matriz de masas utilizando un espectrómetro de masas.
- 45 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el polimorfismo génico es determinado por el procedimiento invasivo o por secuenciación directa.
- 50 7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el polimorfismo génico es determinado por el análisis RCP-RFLP.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el análisis RCP-RFLP detecta, utilizando una enzima de restricción MspI, una mutación desde G hasta C en 4204027 de intrón del gen STAT3 humano: rs2293152.
- 55 9. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el polimorfismo génico es determinado utilizando por lo menos un oligonucleótido seleccionado de entre el grupo constituido por (a) a (d) a continuación: (a) un oligonucleótido que presenta una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T o T/T en la posición 4243095 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs1905341, (b) un oligonucleótido que presenta una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/C en la posición 4264926 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs4796793, (c) un oligonucleótido que presenta una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo G/G en la posición 4204027 del gen STAT3, y representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293152, y (d) un oligonucleótido que presenta una secuencia constituida por por lo menos 10 bases consecutivas que contienen un sitio de polimorfismo génico con genotipo C/T en la posición 4050541 del gen STAT3 (KCNH4), y
- 60
- 65

representado por el número de ID de SNP de referencia: rs2293153.

10. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el par cebador para la detección del polimorfismo génico es cualquiera de (a) a (d) a continuación:

- 5
- (a) un par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 1 y nº 17,
- 10
- (b) un par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 2 y nº 18,
- (c) un par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 3 y nº 19 y
- 15
- (d) un par de cebadores oligonucleotídicos constituidos por las secuencias representadas por las SEC. ID. nº 4 y nº 20.