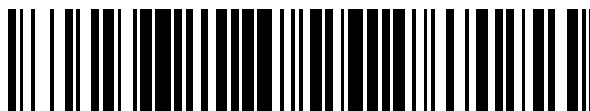


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 165**

21 Número de solicitud: 201231207

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **26.07.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.10.2012

71 Solicitante/s:
HOSPITAL SANT JOAN DE DÉU
Pº Sant Joan de Déu, 2
08950 Esplugues de Llobregat , Barcelona, ES y
FUNDACIÓ CELLEX

72 Inventor/es:
DE TORRES GÓMEZ-PALLETE, Carmen

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

54 Título: **Método de pronóstico de tumores neuroblásticos**

57 Resumen:

Método de pronóstico de tumores neuroblásticos.

La presente invención se refiere a un método de pronóstico de tumores neuroblásticos mediante el genotipado en conjunto de tres variantes genéticas del gen del receptor sensor de calcio, en particular mediante el genotipado de la combinación alélica: rs1801725-rs1042636-rs1801726, y al uso de dicha combinación alélica como factor predictivo de tumores neuroblásticos.

ES 2 388 165 A1

DESCRIPCIÓN

Método de pronóstico de tumores neuroblásticos

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo del pronóstico de tumores. En concreto, se refiere a un método de pronóstico de tumores neuroblásticos basado en el análisis de tres variantes genéticas del gen del receptor sensor de calcio (CASR).

10

Antecedentes de la invención

Se conocen como tumores del desarrollo aquellos que se manifiestan principalmente durante la edad pediátrica o que únicamente se manifiestan en esta etapa. Por esta razón a veces se les denomina también tumores pediátricos. En el contexto de la presente invención se utilizan indistintamente el término tumor del desarrollo o tumor pediátrico.

15

Los tumores neuroblásticos (TN) son tumores del desarrollo que se originan a partir de células precursoras del sistema nervioso periférico e incluyen a los neuroblastomas (NB), ganglioneuroblastomas (GNB) y ganglioneuromas (GN). Se trata de un grupo de tumores muy heterogéneo desde el punto de vista clínico, histológico, genético y biológico. Su presentación clínica incluye un variado espectro que abarca la regresión espontánea, el crecimiento exclusivamente loco-regional y la proliferación agresiva local acompañada de diseminación metastásica.

20

Las bases biológicas responsables de la diversidad clínica de los TN se conocen sólo parcialmente. Entre ellas, destacan las alteraciones de la ploidía, las translocaciones desequilibradas, las deleciones o ganancias de regiones cromosómicas recurrentes y la amplificación del oncogén *MYCN*. Estas alteraciones no sólo son cruciales para entender el comportamiento biológico de los TN, sino que se utilizan para determinar el pronóstico de los TN. Establecer el pronóstico de estos tumores es crítico puesto que de ello depende la selección de la estrategia terapéutica a seguir. Así, los tumores loco-regionales (estadios 1, 2 y 3) sin amplificación de *MYCN* pueden ser tributarios sólo de resección quirúrgica, los tumores con capacidad para involucionar (estadio 4s) pueden no requerir quimioterapia o sólo un mínimo tratamiento que induzca su desaparición, mientras que los NB metastásicos (estadio 4) son tratados con un complejo abordaje que incluye quimioterapia, cirugía, radioterapia, megaterapia seguida de trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos, inmunoterapia y terapias inductoras de diferenciación. Así pues, es necesario establecer con la mayor precisión posible el pronóstico de un TN en el momento de su diagnóstico con el fin de escoger adecuadamente su tratamiento.

25

30

35

El gen humano *CASR* se localiza en la región cromosómica 3q13.3-21. Está compuesto por 6 exones codificantes y dos exones 1 alternativos y no codificantes. *CASR* es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR). En concreto, forma parte de la subfamilia C de los GPCR, junto a ocho receptores del glutamato, dos receptores GABA-B, algunos receptores del gusto y el sensor de aminoácidos GPRC6A. Esta subfamilia de receptores detecta señales de iones, aminoácidos y nutrientes, entre otros, y las transmiten al medio intracelular. Todos ellos comparten una estructura similar que se compone de un gran dominio extracelular amino-terminal, siete hélices transmembrana y una cola intracelular carboxilo-terminal. En el caso de *CASR*, el lugar ortostérico donde tiene lugar la interacción directa con el calcio se halla en el dominio extracelular.

40

45

Se han descrito más de 450 polimorfismos de nucleótido simple en el gen *CASR*. Un polimorfismo de nucleótido simple (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), también llamado variante genética, es una variación en la secuencia del ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma. Una de estas variaciones genéticas debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Si no alcanza el 1% se considera una mutación puntual. Los SNPs descritos en el gen *CASR* se hallan divididos en tres bloques de haplotipos, coincidiendo con la región reguladora 5', la región codificante y el dominio regulador 3'.

50

Tres SNPs localizados en el exón 7 de *CASR* (rs1801725, rs1042636 y rs1801726) se hallan representados en la población general de manera significativa. Codifican cambios de aminoácido en el extremo carboxilo-terminal del receptor, dominio de la proteína responsable de la transducción de señal al interior de la célula. El SNP más común en caucásicos, c.2956G>T (descrito como alelo ancestral>alelo minoritario), produce la sustitución de una alanina (A) por una serina (S) en el aminoácido 986 de la proteína *CASR* (rs1801725). Los otros dos, c.2968A>G (alelo ancestral>alelo minoritario) y c.3031C>G (alelo ancestral> alelo minoritario), codifican, respectivamente, la sustitución de una arginina (R) por una glicina (G) en la posición 990 de la proteína *CASR* (rs1042636) y de una glutamina (Q) por glutamato (E) en el aminoácido 1011 de la proteína *CASR* (rs1801726). Estos SNPs, además de encontrarse en proporciones distintas en las diferentes etnias, han sido relacionados con variaciones en los niveles plasmáticos de Ca^{2+} . También se ha estudiado si existe asociación entre estas variantes genéticas y la susceptibilidad a desarrollar carcinoma colorectal, aunque los datos son contradictorios, ya que algunos estudios encuentran dicha asociación con las variantes de alguno de estos alelos, mientras que otros no (Bacsi K, *et al.*

55

60

65

Effects of the lactase 13910 C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T gene polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. BMC Cancer 2008;8:317; Peters U, *et al.* *Association of genetic variants in the calcium-sensing receptor with risk of colorectal adenoma.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;12:2181-6; Dong LM, *et al.* *Genetic variation in calcium-sensing receptor and risk of colon cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17:2755-65).

Durante muchos años, la clasificación de riesgo de los TN previa a la estratificación del tratamiento ha incluido criterios clínicos (edad al diagnóstico y estadiaje), criterios histológicos (clasificación anatómo-patológica) y el estado de amplificación del oncogén *MYCN* como único parámetro genético-biológico. Recientemente, se ha añadido a esta estratificación el análisis del contenido total de ADN (ploidía), así como el estado alélico de las regiones cromosómicas 1p, 17q y 11q. Sin embargo, el análisis de estas alteraciones no está disponible en todos los hospitales del mundo que diagnostican y tratan tumores del desarrollo. Pero incluso cuando lo están, en algunos casos no puede establecerse con precisión si se trata de tumores favorables o desfavorables biológicamente, con el consecuente riesgo de que los pacientes reciban un tratamiento inadecuado por exceso o por defecto. Además, las pruebas necesarias para analizar dichos parámetros son laboriosas, caras y precisan de personal experimentado tanto para realizarlas como para interpretarlas. Más aún, para poder llevarlas a cabo es preciso disponer de muestras del tumor de alta calidad y en distintos formatos, algo no siempre posible. Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de identificar un método de pronóstico de tumores neuroblásticos de fácil aplicación y de bajo coste económico para que pueda ser realizado en un mayor número de ámbitos clínicos.

Los autores de la presente invención describen un método de pronóstico de TN que comprende el genotipado de un conjunto de únicamente tres SNPs del gen *CASR*. Dicho método se aplica a muestras de sangre periférica e incluso frotis bucales lo que le convierte en un método de rápida y fácil aplicación, además de ser un método de interpretación sencilla, fácilmente reproducible y de bajo coste económico.

Objeto de la invención

La presente invención tiene por objeto un método de pronóstico de un paciente afecto de un tumor neuroblástico que comprende genotipar la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 del gen *CASR* en una muestra biológica aislada del paciente, y donde el haplotipo rs1801725-rs1042636-rs1801726 caracterizado porque el rs1801725 es una T, el rs1042636 es una A y el rs1801726 es una C, se asocia con un riesgo de muerte y de eventos (recaída, progresión, muerte) mayor que si tuviera otro haplotipo.

Asimismo, es objeto de la invención, el uso de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 como factor predictivo de pronóstico de un tumor neuroblástico.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Supervivencia global de los pacientes diagnosticados de tumores neuroblásticos de acuerdo con el estadiaje (estadios 1, 2, 3 y 4s *versus* estadio 4). Se representa la supervivencia acumulada (supervivencia acum) frente al tiempo de seguimiento (seguimiento) en meses.

Figura 2: Supervivencia global de los pacientes diagnosticados de tumores neuroblásticos de acuerdo con el estado de amplificación del oncogén *MYCN* (amplificado *versus* no amplificado). Se representa la supervivencia acumulada (supervivencia acum) frente al tiempo de seguimiento (seguimiento) en meses.

Figura 3: Supervivencia global de los pacientes diagnosticados de tumores neuroblásticos de acuerdo con el genotipo del polimorfismo rs1801725 (homocigotos para el alelo mayoritario G *versus* presencia del alelo minoritario T en homocigosis (T/T) o heterocigosis (G/T)). Se representa la supervivencia acumulada (supervivencia acum) frente al tiempo de seguimiento (seguimiento) en meses.

Figura 4: Supervivencia global de los pacientes diagnosticados de tumores neuroblásticos de acuerdo con el haplotipo rs1801725-rs1042636-rs1801726, donde el haplotipo G-A-C se muestra con una línea continua y el haplotipo T-A-C se muestra con una línea discontinua. Se representa la supervivencia acumulada (supervivencia acum) frente al tiempo de seguimiento (seguimiento) en meses.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene como principal objetivo identificar un factor de predicción de pronóstico de un tumor neuroblástico (TN), más sencillo de aplicar y rápido que los sistemas de clasificación existentes, con el fin de facilitar la estratificación de riesgo de estos tumores y la consecuente toma de decisiones terapéuticas. En el contexto de la presente invención, un tumor neuroblástico se refiere a uno o varios tipos de tumor neuroblástico (neuroblastomas, ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas).

Los autores de la presente invención han identificado la combinación alélica (también referida como haplotipo de la combinación alélica o haplotipo) rs1801725-rs1042636-rs1801726 de tres SNPs del gen *CASR*: rs1801725,

rs1042636 y rs1801726, como un factor de predicción de pronóstico eficaz en pacientes afectados de TN. Así, la presente invención se refiere en un aspecto al uso de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 como factor predictor (también referido como factor predictivo) de TN. En una realización particular, dicha combinación alélica se usa como factor predictivo de NB. En otra realización particular, en la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 el rs1801725 es T, el rs1042636 es A y el rs1801726 es C, es decir, en una realización particular, la presente invención se refiere al uso de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 T-A-C como factor predictivo de TN. En otra realización particular, la presente invención se refiere al uso de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 T-A-C como factor predictivo de NB. Sorprendentemente, la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726, en particular de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 T-A-C, es un factor predictivo independiente de otras variables conocidas como predictoras de pronóstico en tumores neuroblásticos, como son la edad al diagnóstico, el estadiaje, el número de copias de *MYCN* y la clasificación histopatológica (ver Tablas 1, 3A y 3B). Su uso permite, por tanto, predecir el pronóstico de un paciente afecto de un tumor neuroblástico en base únicamente a dicho factor. Cabe destacar otra importante ventaja, ya que dicho factor predictivo puede ser analizado tanto en la sangre del paciente como en un fragmento tumoral, e incluso en un frotis bucal.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de pronóstico (referido también como método de la invención) de un paciente afecto de un tumor neuroblástico que comprende genotipar la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 del gen *CASR* en una muestra biológica aislada del paciente, y donde el haplotipo rs1801725-rs1042636-rs1801726 caracterizado porque el rs1801725 es T, el rs1042636 es A y el rs1801726 es C, es decir, el haplotipo rs1801725-rs1042636-rs1801726 es T-A-C, se asocia con un riesgo o probabilidad de muerte y de eventos mayor que si tuviera otro haplotipo. Como se ha mencionado en el apartado de los antecedentes de la invención, los alelos que se hallan en la población para cada SNP (descritos como alelo ancestral>alelo minoritario) son: G>T para rs1801725, A>G para rs1042636 y C>G para rs1801726. En el método de la invención, cuando el haplotipo rs1801725-rs1042636-rs1801726 hallado en un paciente afecto de un TN es T-A-C, es decir, es T para rs1801725 (alelo minoritario), A para rs1042636 (alelo ancestral) y C para rs1801726 (alelo ancestral), el riesgo o probabilidad de muerte y de eventos es mayor que si tuviera otro haplotipo. En el contexto de la presente invención, se considera que el SNP rs1801725 es T tanto cuando aparece en homocigosis (T/T) como en heterocigosis (G/T).

En el contexto de la presente invención, el término eventos incluye las recaídas y las progresiones, además de las muertes (recaída, progresión, muerte).

En una realización particular del método de la invención, la presencia de dicho haplotipo T-A-C se asocia con un riesgo de muerte y un riesgo de tener eventos al menos dos veces mayor que si tuviera otro haplotipo. En otra realización particular, la presencia de dicho haplotipo T-A-C se asocia con una probabilidad de muerte al menos cuatro veces mayor que si tuviera otro haplotipo y con un riesgo de tener eventos al menos dos veces mayor que si tuviera otro haplotipo.

El genotipado se puede llevar a cabo a partir de cualquier muestra del paciente de la cual se pueda obtener ADN, como es una muestra de tejido tumoral, de sangre periférica e incluso un frotis bucal. La obtención de ADN se lleva a cabo mediante técnicas convencionales, ampliamente conocidos por el experto en la materia. En una realización particular del método de pronóstico de la invención, la muestra biológica empleada es un frotis bucal. En este caso, el método de pronóstico de TN comprende realizar un frotis bucal para el genotipado de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 del gen *CASR*. En otra realización particular del método de pronóstico de la invención, la muestra biológica empleada es sangre periférica. En este caso, el método de pronóstico de TN comprende obtener una muestra de sangre periférica para el genotipado de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 del gen *CASR*. La posibilidad de llevar a cabo el método de la invención con muestras tan baratas y poco invasivas como son el frotis bucal y la sangre periférica hacen del método de la invención un método fácilmente aplicable y de bajo coste económico.

En otra realización particular del método de pronóstico de la invención, la muestra biológica empleada es tejido tumoral, en cuyo caso el método de pronóstico comprende obtener una muestra de tejido tumoral para el genotipado de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 del gen *CASR*. En este caso, la muestra tumoral del paciente representa una porción de la pieza de tumor obtenida mediante cirugía o a una biopsia del tejido tumoral, que puede haber sido congelada o bien fijada y parafinada.

En el contexto de la presente invención, el genotipado del conjunto de los tres SNPs rs1801725, rs1042636 y rs1801726 se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas de biología molecular normalmente utilizadas para el genotipado de SNPs y conocidas por el experto en la materia, como son la tecnología SNPlex, tecnología Taqman, tecnología SnapShot y tecnología MLPA.

En una realización particular del método de pronóstico de la invención, el genotipado de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 del gen *CASR*, se lleva a cabo mediante la Tecnología Taqman. Esta tecnología utiliza la actividad 5' nucleasa de la polimerasa junto con dos sondas TaqMan para discriminar entre los dos alelos de un SNP. Las dos sondas TaqMan son complementarias a los dos alelos de un SNP y cada una

tiene un *quencher* en su extremo 3' y una molécula fluorescente en su extremo 5'. Durante la fase de anillamiento-extensión, la sonda se hibrida a los amplicones y la ADN polimerasa la rompe, lo que resulta en un incremento de la fluorescencia debido a que el *quencher* ya no se encuentra en las proximidades. Distintos sistemas de detección de fluorescencia, conocidos por el experto en la materia, pueden ser utilizados, como por ejemplo *RealTime ABI PRISM® 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems)*, *Sequence Detector Software (SDS) instrument 7500 (Applied Biosystems)* o equipos similares.

En una realización particular del método de pronóstico de la invención, los SNP se genotipan utilizando assays comerciales prediseñados que incluyen el cebador *forward* y el cebador *reverse* así como la sonda específica para el alelo ancestral y la sonda específica para el alelo minoritario o variante; como por ejemplo, los siguientes números de referencia de SNPs *Genotyping Assays* de *Applied Biosystems*: número de referencia 7504853, para el polimorfismo rs1801725; número de referencia 7504854, para el polimorfismo rs1042636; y número de referencia 7504855, para el polimorfismo rs1801726.

Por último, destacar que el método de la invención permite optimizar la selección del tratamiento del paciente, ya que alerta de un pronóstico desfavorable a pesar de que otros parámetros sean favorables. Además, como ya se ha mencionado anteriormente, es un método que puede llevarse a cabo a partir de distintas muestras, como por ejemplo muestras de sangre e incluso de un frotis bucal lo que le convierte en un método de rápida y fácil aplicación, y es un método de interpretación sencilla, fácilmente reproducible y de bajo coste económico.

Ejemplos

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

Ejemplo 1. Análisis de tres variantes genéticas del exón 7 del gen CASR en una cohorte de pacientes afectos de tumores neuroblásticos.

Se analizó el genotipo de tres variantes genéticas, por separado, del exón 7 del gen *CASR* (rs1801725, rs1042636 y rs1801726) en una cohorte de tumores neuroblásticos (n=65). Las características clínicas de los pacientes aparecen detalladas en la Tabla 1 (edad al diagnóstico, estadio clínico, clasificación anatomopatológica, estado de amplificación del oncogén *MYCN*, así como los datos necesarios para calcular la supervivencia global y libre de eventos).

El análisis de los 3 polimorfismos se realizó mediante tecnología Taqman. Brevemente, se aisló ADN genómico de los tumores y de la sangre periférica de los pacientes mediante técnicas estándar. A continuación, las muestras (20 ng de cada ADN) fueron analizadas en un *Sequence Detector Software instrument 7500 (Applied Biosystems)* mediante *Taqman SNPs Genotyping Assays* específicos para cada SNP, en presencia de Taqman Universal Master Mix, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepararon reacciones de 15 µL conteniendo 1xTaqMan Universal PCR Master Mix (7,5 µL), sin AmpErase UNG, el *SNP Genotyping Assay* específico para cada variante (0,75 µL), ADN (20 ng) y agua libre de DNAsas para completar el volumen.

Los assays específicos utilizados para genotipar los SNPs son los siguientes:

- número de referencia 7504853 (*Applied Biosystems*), para el SNP rs1801725.
- número de referencia 7504854 (*Applied Biosystems*), para el SNP rs1042636.
- número de referencia 7504855 (*Applied Biosystems*), para el SNP rs1801726.

En el *SDS instrument 7500 de Applied Biosystems*, se realizó el siguiente programa:

rs1801725, rs1042636			rs1801726		
T (°C)	Tiempo	Nº ciclos	T (°C)	Tiempo	Nº ciclos
50	2'	1	50	2'	1
95	10'	1	95	10'	1
92	15"	40	92	15"	40
64	1'		63	1'	
60	1'	1	60	1'	1

Al final de la reacción, se analiza cuál/es de las sondas muestran amplificación en cada muestra, teniendo en cuenta que, en estos assays, el fluorocromo VIC corresponde al alelo 1 (ancestral) y el fluorocromo FAM corresponde al alelo 2 (variante).

Se comprobó que el resultado observado para cada paciente era igual analizando el ADN de su tumor y el extraído de sus células sanguíneas nucleadas. Los resultados obtenidos para cada paciente se detallan en la Tabla 1.

5 **Tabla 1.** Análisis de los polimorfismos rs1801725, rs1042636 y rs1801726 en una cohorte de pacientes afectados de tumores neuroblásticos.

Muestra #	Edad al diagnóstico (<18 meses=0; ≥18 meses=1)	Estadaje (1, 2, 3, 4s=0; 4=1)	Clasif. Anatómo-patológica (Shimada) (1=desfavorable, 0=favorable)	Amplificación MYCN (no=0, amplificado=1)	Raza (caucásicos=0)	Evento (1=evento, 0=No evento)	Evento=recaída, progresión (PD=1; evento=0)	Estado (1=muerto, 0=vivo)	Follow-up (FU) días	FU evento días	rs1801725	rs1042636	rs1801726
1	1	1	1	0	0	1	1	1	2798	1582	G/T	R/R	Q/Q
2	1	1	1	0	0	1	0	1	272	272	G/T	R/R	Q/Q
3	1	1	1	1	0	1	1	1	269	269	G/T	R/R	Q/E
4	1	1	1	1	0	1	1	1	209	209	G/G	R/R	Q/Q
5	1	0	1	1	0	1	1	1	617	405	G/T	R/R	Q/Q
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1614		G/T	R/R	Q/Q
7	1	0	1	1	0	1	1	0	1370	518	G/G	R/R	Q/Q
8	1	0	1	1	0	0	0	0	2627		G/T	R/R	Q/Q
9	1	1	1	1	0	0	0	0	913		G/G	R/R	Q/Q
10	1	1	1	0	0	1	1	1	772	772	G/T	R/R	Q/Q
11	1	1	1	0	0	1	1	0	2313	561	G/T	R/R	Q/Q
12	0	0	0	0	0	0	0	0	2101		G/G	R/R	Q/Q
13	0	0	0	0	0	0	0	0	1491		G/G	R/R	Q/Q
14	1	0	1	1	0	0	0	0	1736		G/G	R/R	Q/Q
15	0	0	0	0	0	0	0	0	1461		G/T	R/R	Q/Q
16	1	1	1	0	0	1	1	1	1306	486	G/T	R/G	Q/Q
17	0	0	0	0	0	0	0	0	2891		G/T	R/R	Q/Q
18	0	1	0	0	0	0	0	0	1033		G/T	R/R	Q/Q
19	0	0	0	0	0	0	0	0	2891		G/G	G/G	Q/Q
20	0	0	0	0	0	0	0	0	2313		G/G	R/R	Q/Q
21	0	0	0	0	0	0	0	0	2282		G/G	R/G	Q/Q
22	0	0	0	0	0	0	0	0	1217		G/G	R/R	Q/Q
23	1	1	1	0	0	1	1	1	419	419	G/G	R/R	Q/Q
24	0	0	0	0	0	0	0	0	1147		G/G	R/R	Q/Q
25	0	0	1	0	0	0	0	0	913		G/G	R/R	Q/Q
26	0	0	0	0	0	0	0	0	913		G/G	R/R	Q/Q
27	0	0	0	0	0	0	0	0	640		G/G	R/R	Q/Q
28	1	0	1	0	0	0	0	0	640		G/G	R/R	Q/Q
29	0	0	0	0	0	0	0	0	2344		G/G	R/R	Q/Q
30	0	0	0	0	0	0	0	0	1644		G/G	R/R	Q/Q
31	1	0	1	0	0	1	1	0	1614	1048	G/G	R/R	Q/Q
32	0	0	0	0	0	0	0	0	2070		G/G	R/R	Q/Q
33	1	0	0	0	0	0	0	0	1399		G/G	R/G	Q/Q
34	1	1	1	0	0	1	1	1	1249	580	G/G	R/R	Q/Q
35	1	0	0	0	0	0	0	0	3562		G/G	R/R	Q/Q
36	1	0	0	0	0	0	0	0	3287		G/G	R/R	Q/Q
37	1	0	0	0	0	0	0	0	2344		G/G	R/R	Q/Q
38	1	0	0	0	0	0	0	0	1736		G/G	R/R	Q/Q
39	0	0	0	0	0	0	0	0	1430		G/G	R/R	Q/E
40	1	0	0	0	0	0	0	0	769		G/T	R/R	Q/Q

(continuación)

41	0	1	0	0	0	0	0	0	275		T/T	R/R	Q/Q
42	0	1	1	0	0	1	1	1	1363		G/T	R/R	Q/Q
43	1	1	1	0	0	1	1	1	312	298	G/T	R/R	Q/Q
44	1	1	1	0	0	1	1	1	640	530	T/T	R/R	Q/Q
45	1	1	1	0	0	1	1	0	1522	246	G/G	R/G	Q/Q
46	1	1	0	0	0	0	0	0	913		G/T	R/G	Q/Q
47	1	1	1	1	0	1	1	1	528	321	G/G	R/R	Q/Q
48	1	1	1	0	0	0	0	0	668		G/G	R/R	Q/Q
49	1	1	1	0	0	1	1	0	672	232	G/T	R/R	Q/Q
50	1	1	1	1	0	0	0	0	511		G/G	R/R	Q/Q
51	0	1	1	1	0	1	0	1	151	151	T/T	R/R	Q/Q
52	1	1	1	1	0	1	1	0	668	511	G/G	R/R	Q/Q
53	1	1	1	0	0	0	0	0	275		G/G	R/G	Q/Q
54	1	1	0	0	0	0	0	0	288		G/G	R/R	Q/Q
55	1	1	1	1	0	1	1	1	1204	366	G/G	R/R	Q/Q
56	0	1	1	1	0	1	0	1	622	622	G/G	R/R	Q/Q
57	1	1	0	0	0	0	0	0	1309		G/T	R/R	Q/E
58	1	1	0	0	0	0	0	0	579		G/G	R/R	Q/Q
59	0	1	1	1	0	1	0	1	316	316	G/T	R/R	Q/Q
60	0	0	0	0	1	0	0	0	315		G/G	R/R	Q/E
61	1	0	0	0	0	0	0	0	975		G/G	R/R	Q/Q
62	1	0	0	0	0	0	0	0	2922		G/G	R/R	Q/Q
63	1	0	1	0	0	1	1	0	1034	364	G/G	R/R	Q/Q
64	0	0	0	0	0	0	0	0	170		G/G	R/R	Q/Q
65	1	0	0	0	0	0	0	0	273		G/G	R/R	Q/Q

Ejemplo 2. Análisis de la supervivencia global y libre de eventos de los pacientes afectos de tumores neuroblásticos en función del genotipo de 3 polimorfismos del exón 7 del gen CASR.

5 Se analizó la supervivencia global y libre de eventos de la cohorte de pacientes afectos de tumores neuroblásticos en función del genotipo de cada polimorfismo por separado. Se observó entonces que la presencia del alelo minoritario correspondiente al SNP rs1801725 (analizados conjuntamente los pacientes con este alelo en homocigosis y heterocigosis), se asociaba con una peor supervivencia global (Tabla 2A y Figura 3) y libre de eventos (Tabla 2B). En el análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de la cohorte completa 10 (n=65), se observaba que éste era un factor pronóstico independiente. Sin embargo, cuando se restringió el análisis a aquellos pacientes que habían sido seguidos durante más de 3 años (n=44), este factor ya no se mostraba como factor predictivo independiente (P = 0,090).

Tabla 2A.- Supervivencia global con respecto al genotipo.

Genotipo	n (%)	Muertes n (%)	Overall survival (media, 95% CI)	P Log rank	OS	
					HR (95% CI)	p HR
rs1801725						
G/G	43 (66,16)	6 (13,95)	101,33 (88,60-114,07)		1,00	
G/T+T/T	22 (33,84)	11 (50)	56,52 (39,45-73,58)	0,003	4,61 (1,22-17,44)	0,025
rs1042636						
A/A	58 (89,23)	16 (27,58)	84,40 (70,51-98,28)		1,00	
A/G+G/G	7 (10,77)	1 (14,29)	85,80 (67,28-104,32)	0,369	0,44 (0,05-3,59)	0,443
rs1801726						
C/C	61 (93,85)	16 (26,23)	86,53 (73,44-99,62)		1,00	
C/G	4 (6,15)	1 (25)	37,99 (21,57-54,41)	0,84	1,13 (0,14-8,99)	0,91

15 OS: Overall survival (supervivencia global). HR: Hazard ratio (modelo de regresión de Cox, ajustando por factores pronósticos en neuroblastoma: edad al diagnóstico, estadio clínico y estado de amplificación del oncogén MYCN). CI: intervalo de confianza.

Tabla 2B.- Supervivencia libre de eventos con respecto al genotipo.

Genotipo	n (%)	Eventos n(%)	EFS (media, 95% CI)	P Log rank	EFS	
					HR (95% CI)	p HR
rs1801725						
G/G	43 (66,16)	11 (25,58)	87,87 (72,44-103,301)		1,00	
G/T+T/T	22 (33,84)	13 (59,09)	44,47 (27,52-61,42)	0,011	2,06 (0,79-5,36)	0,141
rs1042636						
A/A	58 (89,23)	22 (37,93)	73,67 (59,28-88,06)		1,00	
A/G+G/G	7 (10,77)	2 (28,57)	70,03 (39,53-100,53)	0,725	1,13 (0,25-5,11)	0,871
rs1801726						
C/C	61 (93,85)	23 (37,70)	74,42 (60,53-88,31)		1,00	
C/G	4 (6,15)	1(25)	37,99 (21,57-54,41)	0,859	0,68 (0,09-5,23)	0,715

5 EFS: *Event-free survival* (supervivencia libre de eventos). HR: *Hazard ratio* (modelo de regresión de Cox, ajustando por factores pronósticos en neuroblastoma: edad al diagnóstico, estadio clínico y estado de amplificación del oncogén *MYCN*). CI: intervalo de confianza.

10 **Ejemplo 3. Análisis de la supervivencia global y libre de eventos de los pacientes afectados de tumores neuroblásticos en función del haplotipo correspondiente a la combinación de 3 polimorfismos del exón 7 del gen *CASR*.**

15 Se analizó la supervivencia global y libre de eventos de la cohorte de pacientes afectados de tumores neuroblásticos en función del haplotipo correspondiente a la combinación de alelos rs1801725-rs1042636-rs1801726. Como se ha mencionado anteriormente, los alelos que se hallan en la población para cada SNP (descritos como alelo ancestral>alelo minoritario) son: G>T para rs1801725, A>G para rs1042636 y C>G para rs1801726 y se considera que el SNP rs1801725 es T cuando la T está presente tanto en homocigosis (T/T) como en heterocigosis (G/T). Se observó entonces que la combinación alélica T-A-C se asociaba con una mayor probabilidad de muerte (Tabla 3A, HR 4,32; 95% CI: 1,59 – 11,78) y de eventos (Tabla 3B, HR 2,19; 95% CI: 1,06 – 4,50). Se muestra el análisis mediante curvas de Kaplan-Meier en la Figura 4, en comparación con las curvas generadas en función del estadiaje (Figura 1), el estado de amplificación del oncogén *MYCN* (Figura 2) y el polimorfismo rs1801725 (Figura 3).

25 Mediante el modelo de regresión de Cox se pudo establecer que el haplotipo resultante de la combinación de estas 3 variantes genéticas (rs1801725-rs1042636-rs1801726) sí era un factor predictivo de pronóstico independiente de otras variables predictivas de pronóstico ya conocidas en TN, como son edad al diagnóstico, estadiaje y estado de amplificación del oncogén *MYCN* (Tablas 3A y 3B).

Tabla 3A.- Supervivencia global en función del haplotipo correspondiente a la combinación de 3 polimorfismos del exón 7 del gen *CASR*.

Haplotipo	Frecuencia haplotipo %			OS	
	Muestra total (n=65)	Vivos (n=48)	Muertos (n=17)	HR (95% CI)	p HR
G-A-C	71,54	77,08	55,88	1	
T-A-C	19,23	12,5	38,24	4,32 (1,59 - 11,78)	0,0042
G-G-C	6,15	7,29	2,94	0,67 (0,07 - 6,64)	0,7345
G-A-G	3,08	3,13	2,94	0,74 (0,07 - 7,69)	0,7975

5 OS: *Overall survival* (supervivencia global). HR: *Hazard ratio* (modelo de regresión de Cox, ajustando por factores pronósticos en neuroblastoma: edad al diagnóstico, estadio clínico y estado de amplificación del oncogén *MYCN*). CI: Intervalo de confianza.

10 **Tabla 3B.-** Supervivencia libre de eventos en función del haplotipo correspondiente a la combinación de 3 polimorfismos del exón 7 del gen *CASR*.

Haplotipo	Frecuencia haplotipo %			EFS	
	Muestra total (n=65)	EFS (%)	Eventos (%)	HR (95% CI)	p HR
G-A-C	71,54	76,83	62,50	1,00	
T-A-C	19,23	12,19	31,25	2,19 (1,06 - 4,50)	0,0332
G-A-G	6,15	3,66	2,08	0,60 (0,07 - 5,31)	0,6463
G-G-C	3,08	7,32	4,12	1,04 (0,22 - 4,93)	0,9601

15 EFS: *Event-free survival* (supervivencia libre de eventos). HR: *Hazard ratio* (modelo de regresión de Cox, ajustando por factores pronósticos en neuroblastoma: edad al diagnóstico, estadio clínico y estado de amplificación del oncogén *MYCN*). CI: Intervalo de confianza.

20 Tal y como se observa en las Tablas 3A y 3B, un paciente con un tumor neuroblástico y que tiene el haplotipo T-A-C (rs1801725-rs1042636-rs1801726) tiene un riesgo 4,32 veces mayor de muerte y 2,19 de tener eventos (recaída, progresión) que si tuviera otro haplotipo. Esto sirve para alertar a la hora de decidir su tratamiento, a pesar de que otros parámetros sean favorables. Las combinaciones G-A-G y G-G-C son tan minoritarias que no se puede afirmar estadísticamente que tengan menor riesgo de muerte o evento como parecería en función del HR.

25 Sorprendentemente, cuando se analizó el grupo de pacientes con un tiempo de seguimiento superior a 3 años (n=44), el haplotipo T-A-C seguía mostrando capacidad de predecir pronóstico de manera independiente: para supervivencia global, HR 3,12 (95% CI 1,13 – 8,60), P = 0,028.

30 **Ejemplo 4. Análisis de la supervivencia global y libre de eventos de los pacientes afectados de neuroblastomas en función del haplotipo correspondiente a la combinación de 3 polimorfismos del exón 7 del gen *CASR*.**

35 Debido a que dentro del grupo de los TN son los neuroblastomas los que presentan un mayor grado de dificultad a la hora de establecer un pronóstico y seleccionar la estrategia terapéutica, se procedió al análisis de la supervivencia global y libre de eventos del subgrupo de los neuroblastomas en función del haplotipo T-A-C. Las características de los pacientes y el análisis correspondiente de los 3 SNPs aparecen detallados en la Tabla 4.

40 Se comprobó así que los pacientes portadores de la combinación alélica T-A-C tenían también peor supervivencia global y libre de eventos, y que, de nuevo, este era un factor predictivo independiente en el análisis multivariante, con una mayor significación estadística para la predicción de supervivencia global:

OS: HR = 5,572 (1,81-17,1786) P=0,002783
 EFS: HR = 2,127(1,001-4,218) P=0,049646.

Tabla 4. Análisis de los polimorfismos rs1801725, rs1042636 y rs1801726 en una cohorte de pacientes afectados de neuroblastoma.

5

Muestra #	Edad al diagnóstico (<18 meses=0; ≥18 meses=1)	Estadaje (1, 2, 3, 4s=0; 4=1)	Clasif. Anatómo-patológica (Shimada) (1=desfavorable, 0=favorable)	Amplificación MYCN (no=0, amplificado=1)	Raza (caucásicos=0)	Evento (1=evento, 0=No evento)	Evento=recaída, progresión (PD=1; evento=0)	Estado (1=muerto, 0=vivo)	Follow-up (FU) días	FU evento días	rs1801725	rs1042636	rs1801726
1	1	1	1	0	0	1	1	1	2798	1582	G/T	R/R	Q/Q
2	1	1	1	0	0	1	0	1	272	272	G/T	R/R	Q/Q
3	1	1	1	1	0	1	1	1	269	269	G/T	R/R	Q/E
4	1	1	1	1	0	1	1	1	209	209	G/G	R/R	Q/Q
5	1	0	1	1	0	1	1	1	617	405	G/T	R/R	Q/Q
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1614		G/T	R/R	Q/Q
7	1	0	1	1	0	1	1	0	1370	518	G/G	R/R	Q/Q
8	1	0	1	1	0	0	0	0	2627		G/T	R/R	Q/Q
9	1	1	1	1	0	0	0	0	913		G/G	R/R	Q/Q
10	1	1	1	0	0	1	1	1	772	772	G/T	R/R	Q/Q
11	1	1	1	0	0	1	1	0	2313	561	G/T	R/R	Q/Q
12	0	0	0	0	0	0	0	0	2101		G/G	R/R	Q/Q
13	0	0	0	0	0	0	0	0	1491		G/G	R/R	Q/Q
14	1	0	1	1	0	0	0	0	1736		G/G	R/R	Q/Q
15	0	0	0	0	0	0	0	0	1461		G/T	R/R	Q/Q
16	1	1	1	0	0	1	1	1	1306	486	G/T	R/G	Q/Q
17	0	0	0	0	0	0	0	0	2891		G/T	R/R	Q/Q
18	0	1	0	0	0	0	0	0	1033		G/T	R/R	Q/Q
19	0	0	0	0	0	0	0	0	2891		G/G	G/G	Q/Q
20	0	0	0	0	0	0	0	0	2313		G/G	R/R	Q/Q
21	0	0	0	0	0	0	0	0	2282		G/G	R/G	Q/Q
22	0	0	0	0	0	0	0	0	1217		G/G	R/R	Q/Q
23	1	1	1	0	0	1	1	1	419	419	G/G	R/R	Q/Q
24	0	0	0	0	0	0	0	0	1147		G/G	R/R	Q/Q
25	0	0	1	0	0	0	0	0	913		G/G	R/R	Q/Q
26	0	0	0	0	0	0	0	0	913		G/G	R/R	Q/Q
27	0	0	0	0	0	0	0	0	640		G/G	R/R	Q/Q
28	1	0	1	0	0	0	0	0	640		G/G	R/R	Q/Q
29	0	0	0	0	0	0	0	0	2344		G/G	R/R	Q/Q
30	0	0	0	0	0	0	0	0	1644		G/G	R/R	Q/Q
31	1	0	1	0	0	1	1	0	1614	1048	G/G	R/R	Q/Q
41	0	1	0	0	0	0	0	0	275		T/T	R/R	Q/Q
42	0	1	1	0	0	1	1	1	1363		G/T	R/R	Q/Q
43	1	1	1	0	0	1	1	1	312	298	G/T	R/R	Q/Q
44	1	1	1	0	0	1	1	1	640	530	T/T	R/R	Q/Q
45	1	1	1	0	0	1	1	0	1522	246	G/G	R/G	Q/Q
46	1	1	0	0	0	0	0	0	913		G/T	R/G	Q/Q
47	1	1	1	1	0	1	1	1	528	321	G/G	R/R	Q/Q
48	1	1	1	0	0	0	0	0	668		G/G	R/R	Q/Q
49	1	1	1	0	0	1	1	0	672	232	G/T	R/R	Q/Q

ES 2 388 165 A1

(continuación)

50	1	1	1	1	0	0	0	0	511		G/G	R/R	Q/Q
51	0	1	1	1	0	1	0	1	151	151	T/T	R/R	Q/Q
52	1	1	1	1	0	1	1	0	668	511	G/G	R/R	Q/Q
53	1	1	1	0	0	0	0	0	275		G/G	R/G	Q/Q
54	1	1	0	0	0	0	0	0	288		G/G	R/R	Q/Q
55	1	1	1	1	0	1	1	1	1204	366	G/G	R/R	Q/Q
56	0	1	1	1	0	1	0	1	622	622	G/G	R/R	Q/Q
57	1	1	0	0	0	0	0	0	1309		G/T	R/R	Q/E
58	1	1	0	0	0	0	0	0	579		G/G	R/R	Q/Q
59	0	1	1	1	0	1	0	1	316	316	G/T	R/R	Q/Q
60	0	0	0	0	1	0	0	0	315		G/G	R/R	Q/E
63	1	0	1	0	0	1	1	0	1034	364	G/G	R/R	Q/Q
64	0	0	0	0	0	0	0	0	170		G/G	R/R	Q/Q
65	1	0	0	0	0	0	0	0	273		G/G	R/R	Q/Q

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de pronóstico de un paciente afecto de un tumor neuroblástico que comprende genotipar la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 del gen *CASR* en una muestra biológica aislada del paciente, donde el haplotipo correspondiente a la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 está caracterizado porque el rs1801725 es una T, el rs1042636 es una A y el rs1801726 es una C y se asocia con un riesgo de muerte y de eventos mayor que si tuviera otro haplotipo.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, donde la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 T-A-C se asocia con un riesgo de muerte y de eventos al menos dos veces mayor que si tuviera otro haplotipo.
3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, donde la muestra biológica empleada es sangre periférica.
- 15 4. Método, según la reivindicación 1 ó 2, donde la muestra biológica empleada es un frotis bucal.
5. Método, según la reivindicación 1 ó 2, donde la muestra biológica empleada es tejido tumoral.
- 20 6. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el genotipado de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 se lleva a cabo mediante la técnica Taqman.
7. Uso de la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 como factor predictivo de pronóstico de un tumor neuroblástico.
- 25 8. Uso según la reivindicación anterior donde la combinación alélica rs1801725-rs1042636-rs1801726 es T-A-C.
9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 como factor predictivo de pronóstico de un neuroblastoma.

30

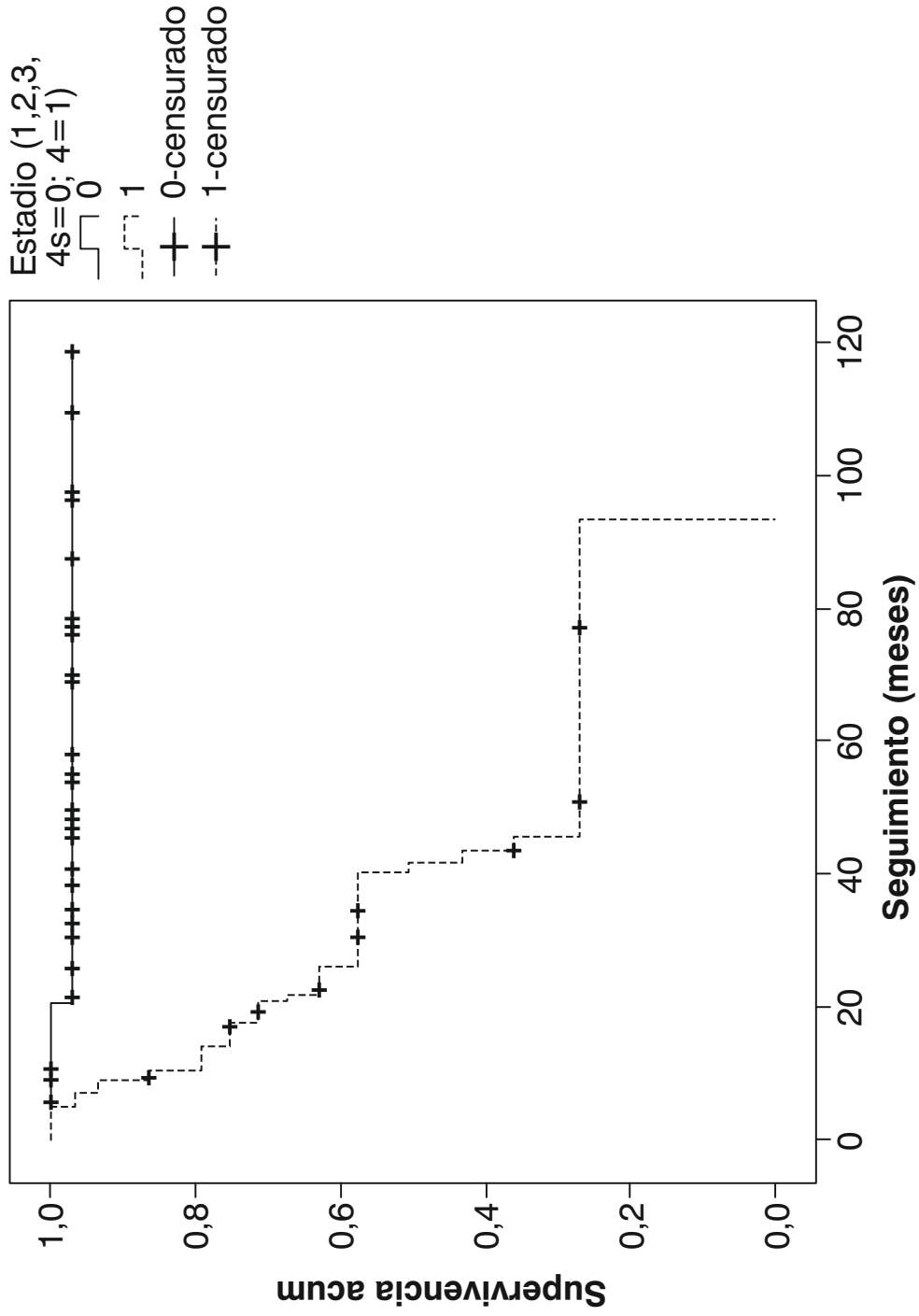


FIG. 1

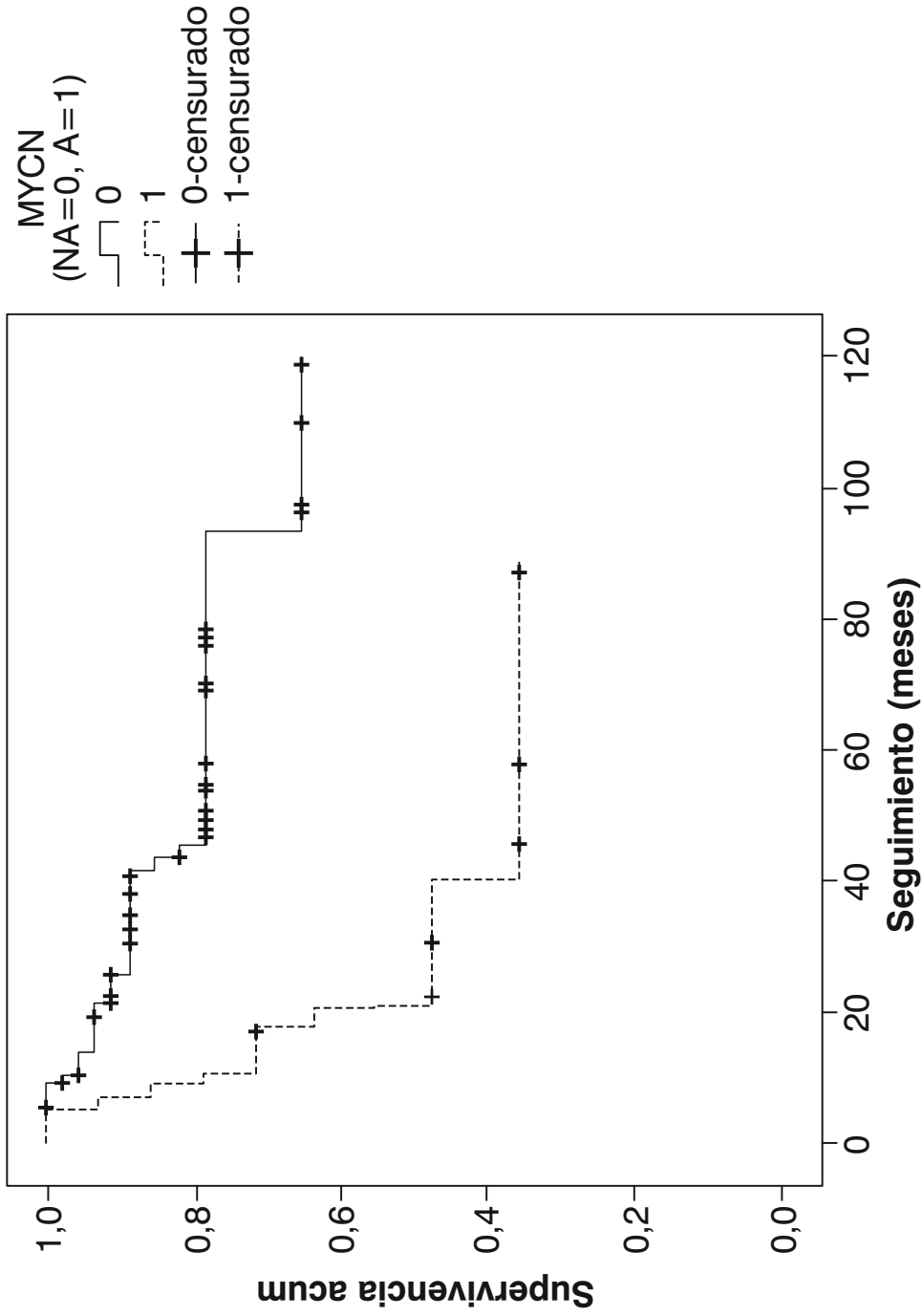


FIG. 2

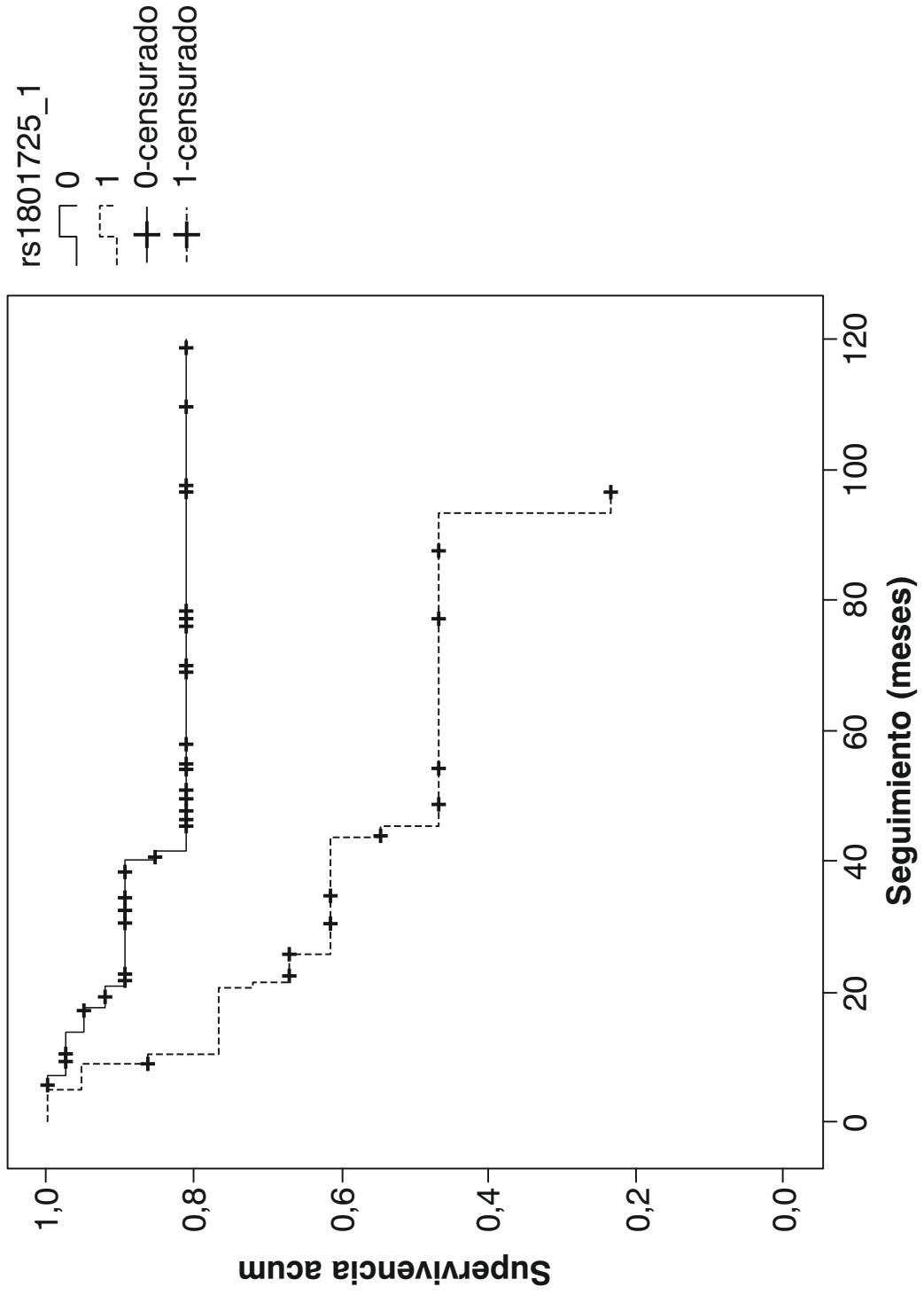


FIG. 3

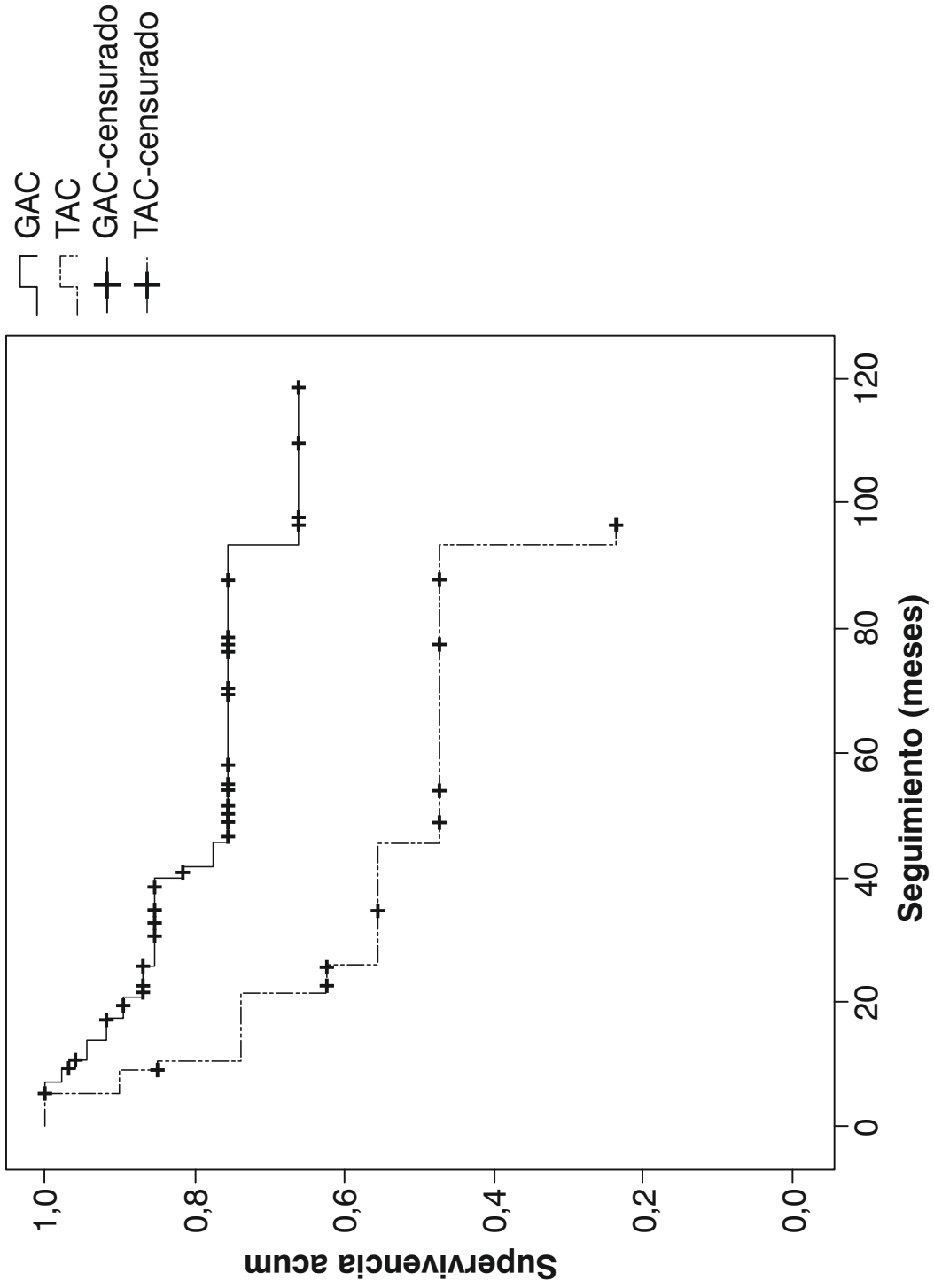


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201231207

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCILLITANI ALFREDO <i>et al.</i> Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. The Journal of clinical endocrinology and metabolism Nov 2004. Vol. 89 , No. 11, Páginas: 5634-5638. Isbn: ISSN 0021-972X (Impreso). Ver todo el documento.	1-9
A	PETERS ULRIKE <i>et al.</i> Association of genetic variants in the calcium-sensing receptor with risk of colorectal adenoma. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology Dec 2004. Vol. 13, No. 12, Páginas: 2181-2186. Isbn: ISSN 1055-9965 (Impreso). Ver todo el documento.	1-9
A	KAPUR KAREN <i>et al.</i> Genome-wide meta-analysis for serum calcium identifies significantly associated SNPs near the calcium-sensing receptor (CASR) gene. PLoS genetics Jul 2010. Vol. 6, No. 7, Páginas: e1001035. Isbn: ISSN 1553-7404 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.09.2012

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

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

C12Q

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

EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, GeneCards

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SCILLITANI ALFREDO <i>et al.</i> The Journal of clinical endocrinology and metabolism Nov 2004. Vol. 89, No. 11, Páginas: 5634-5638. Isbn: ISSN 0021-972X (Impreso).	Noviembre-2004
D02	PETERS ULRIKE <i>et al.</i> Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. Dec 2004. Vol. 13, No. 12, Páginas: 2181 - 2186. Isbn: ISSN 1055-9965 (Impreso).	Diciembre-2004
D03	KAPUR KAREN <i>et al.</i> PLoS genetics Jul 2010. Vol. 6, No. 7, Páginas: e1001035. Isbn: ISSN 1553-7404 (Electrónico).	Julio-2010

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método de pronóstico de tumores neuroblásticos basado en el genotipado de la combinación alélica de 3 polimorfismos (SNPs) del gen del receptor sensor de calcio (CASR) humano, rs1801725, rs1042636 y rs1801726, de forma que la combinación alélica T-A-C se asocia con mayor riesgo de muerte y de eventos.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa el procedimiento de la solicitud, ni documentos que, solos o en combinación, divulguen información que pudiera conducir de forma evidente al método reivindicado, por lo que la invención es nueva y tiene actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, respectivamente.

En los documentos que se citan en este informe se emplea también el genotipado de estos tres SNPs en conjunto, aunque se asocian con otras enfermedades o estados fisiológicos diferentes de los tumores neuroblásticos, y las combinaciones alélicas son diferentes. Por tanto, ninguno de los documentos comentados a continuación afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Así, en el documento D01 se estudia la relación entre determinados genotipos de estos tres SNPs (incluyendo el haplotipo T-A-C, reivindicado en la solicitud) y la concentración de calcio ionizado en sangre, que se asocia, entre otras, con enfermedades renales.

En el documento D02 también se utiliza la combinación alélica de estos tres SNPs para determinar un riesgo patológico, concretamente el adenoma colorectal. De nuevo, el haplotipo más adecuado para ello no es el reivindicado en la solicitud, aunque éste también forme parte del estudio.

Finalmente, el documento D03 es un reciente estudio de meta-análisis que asocia determinados SNPs con los niveles de calcio en sangre (y, por consiguiente, con desórdenes de metabolismo de hueso, y mortalidad cardiovascular). Los resultados indican que la gran mayoría de los SNPs encontrados se encuentran en el gen CASR.