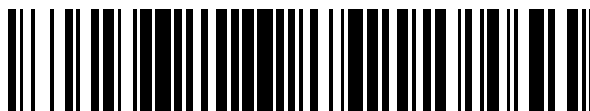


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 076**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10010352 .2**  
96 Fecha de presentación: **28.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2275539**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2011**

54 Título: **Un kit para juzgar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos**

30 Prioridad:  
**29.07.2003 JP 2003281937**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2012**

73 Titular/es:  
**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)**  
**2-9 Kandatsukasacho, Chiyoda-ku**  
**Tokyo 101-8535 , JP**

72 Inventor/es:  
**SUEMATSU, KOJI y**  
**HASEGAWA, KOUICHI**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 391 076 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

Un kit para juzgar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos.

**Campo de la técnica**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos mediante el uso, como índice, de un polimorfismo del gen del sustrato 2 del receptor de la insulina humana; a un procedimiento de detectar el polimorfismo genético empleado como índice de la evaluación del riesgo mencionada anteriormente; a oligonucleótidos empleados para estos procedimientos; y a un kit para la evaluación y/o la detección.

**Técnica anterior**

10 El pilar principal de la medicina moderna es la terapia farmacológica, que emplea fármacos para tratar o prevenir diversas enfermedades. Casi todos los fármacos empleados en la terapia farmacológica (p. ej., compuestos de bajo peso molecular) son, intrínsecamente, sustancias extrañas para el cuerpo humano y, por tanto, la administración de dichos fármacos proporciona eficacia terapéutica pero puede producir diversos efectos secundarios. Dichos efectos secundarios a menudo hacen que se abandone la terapia farmacológica. Asimismo, algunos fármacos se han  
15 encontrado una situación en la que la investigación y el desarrollo se tienen que suspender debido a efectos secundarios graves, aunque se ha demostrado que los fármacos son útiles para pacientes con una enfermedad determinada. Además, el uso de algún otro fármaco está estrictamente regulado con el fin de detectar el signo de sus efectos secundarios mediante exploraciones obligatorias.

20 De acuerdo con las estadísticas publicadas en EE.UU., los casos de efectos secundarios inducidos por fármacos constituyen dos millones o más al año y más de 100.000 debido a dichos efectos secundarios (JAMA, 279, 1200 (1998)). En Japón, se han notificado 26.545 de efectos secundarios inducidos por fármacos (incluidos casos notificados de forma redundante) y 1.239 muertes por dichos efectos secundarios solo en el año 2000 (Ministry of Health, Labor and Welfare, June 6, 2003, House of Representatives, Responsive Pleading No. 55).

25 Entre los efectos secundarios debidos a la administración de fármacos, la granulocitopenia es un efecto secundario mortal. En particular, una disminución en los granulocitos tiende a producir una infección y el inicio de agranulocitosis implica un riesgo muy alto de enfermedad infecciosa grave, tal como neumonía o sepsis. Ejemplos de fármacos que en general se sabe que inducen granulocitopenia incluyen fármacos analgésicos-antipiréticos (aminopirina), antibióticos (clomicetina), fármacos antitiroideos (merazol), fármacos anticonvulsivos, fármacos antidiabéticos y fármacos diuréticos. Es menos probable que la aparición de efectos secundarios causados por dicho fármaco esté relacionada con su dosis y se considera que está relacionada con la predisposición de un paciente (p.  
30 ej., predisposición alérgica o idiosincrasia). Por tanto, la aparición de dichos efectos secundarios es casi imposible de predecir. Con el fin de evitar la aparición de dichos efectos secundarios, los médicos deben manejar sus respectivos casos cuidadosamente, mediante entrevistas detalladas con pacientes individuales con respecto a, por ejemplo, los registros de administración de fármacos en otros departamentos, un análisis de los resultados de análisis de sangre etc. Es notable el hecho de que si y cuando un paciente presenta un inicio de un efecto secundario de granulocitopenia, los médicos deberán tomar medidas inmediatas, incluida la hospitalización.

35 Se conocen otros fármacos que inducen granulocitopenia, entre los que se incluye dibenzodiazepina (clozapina), que es un fármaco antipsicótico. Cabe esperar que este fármaco tenga una eficacia alta, pero los ensayos clínicos del fármaco en Japón se han suspendido. Otros fármacos que inducen granulocitopenia incluyen vesnarinona, que tiene actividades inhibitoras sobre PDE3 y los canales de K. Este fármaco es un fármaco inotrópico eficaz que es menos probable que produzca arritmias y otros acontecimientos cardíacos (p. ej., inicio de insuficiencia cardíaca y hospitalización). No obstante, la administración de este fármaco puede producir efectos secundarios, por ejemplo leucopenia, granulocitopenia y la posterior agranulocitosis. Por tanto, el uso de este fármaco está estrictamente limitado.

45 Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son los marcadores genéticos más usados en los análisis genéticos humanos. Ya se ha demostrado que los SNP son marcadores útiles para un estudio de asociación entre los antecedentes genéticos y las enfermedades habituales o respuestas farmacológicas (véanse los documentos no patentes 1, 2 y 3). Como se sabe, el análisis del haplotipo, construido con múltiples SNP, es útil para analizar la susceptibilidad de enfermedades poligénicas (véanse los documentos no patentes 4 y 5). En la práctica, algunas enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer y la hipertensión, ya han sido analizadas intensamente mediante dicho procedimiento de análisis (Jeunemaitre, X., y col., Am. J. Hum. Genet., 60,1448-1460 (1997); Martin, E. R., Am. J. Hum. Genet., 67, 383-394 (2000)).

55 En los últimos años, los avances en el análisis del genoma han conducido al desarrollo de la toxicogenómica, que estudia la relación entre genes y toxicidades, tales como el efecto de un fármaco sobre el citocromo P450 (CYP) (es decir, una enzima de metabolismo de fármacos). En concreto, los estudios de asociación de antecedentes genéticos individuales y la sensibilidad/respuesta se han propuesto como una herramienta potente para acarar la causa de los efectos adversos. Cabe esperar que la denominada terapia adaptada se realice a través de estos enfoques.

Documento no patente 1: Brookes, A. J., "The essence of SNPs," *Gene*, USA, (1999),234,177-186

Documento no patente 2: Cargill, M, y col., "Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes," *Nature Genet.*, USA, (1999),22,231-238

5 Documento no patente 3: Evans, W. E., & Reiling, M. V., "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics," *Science*, USA, (1999),286,487-491

Documento no patente 4: Stephens, J. C., et al., "Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes," *Am. J. Hum. Genet.*, USA, (1998), 62,1507-1515

Documento no patente 5: Tishkoff, S. A., y col., "The accuracy of statistical methods for estimation of haplotype frequencies: an example from the CD4 locus," *Am. J. Hum. Genet.*, USA, (2000), 67, 518-522

10 **Divulgación de la invención**

**Problemas que ha de resolver la invención**

15 Un objetivo principal de la presente invención es proporcionar medios para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos mediante el uso, como índice, de polimorfismos del gen del sustrato 2 del receptor de la insulina humana o medios para detectar los polimorfismos genéticos empleados como índice para el medio de evaluación del riesgo. Medios para resolver los problemas

20 Con el fin de resolver los problemas mencionados anteriormente, en primer lugar, los presentes inventores han seleccionado, como genes para el análisis de los polimorfismos, 115 genes candidatos, incluidos los genes relacionados con las citocinas, genes de la región del MHC, genes relacionados con G-CSF, genes relacionados con el TNF- $\alpha$ , genes relacionados con NF $\kappa$ , genes relacionados con AMPc y genes relacionados con los canales de K, en los que se buscaron SNP en estos genes candidatos de la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido japoneses y se escogieron 188 SNP candidatos para análisis.

25 Posteriormente, los presentes inventores han determinado la frecuencia de esos SNP en el ADN genómico de las muestras de los siguientes dos grupos: un grupo de sujetos con granulocitopenia inducida por la administración de un fármaco específico y un grupo de sujetos sin granulocitopenia que han recibido el mismo fármaco. Como resultado, los presentes inventores han confirmado que los SNP con la diferencia más estadísticamente significativa entre los dos grupos mencionados anteriormente están presentes en el gen del sustrato 2 del receptor de insulina (J-SNP 10: IMS-JST040476) (en lo sucesivo se hará referencia al gen como "gen IRS-2").

30 Además, los presentes inventores han realizado amplios estudios sobre la relación entre los polimorfismos en el gen IRS-2 humano y la granulocitopenia inducida por fármacos, y, como resultado, han confirmado que seis SNP del gen de IRS-2 humano están estrechamente relacionados con la granulocitopenia inducida por la administración del fármaco. Los presentes inventores han descubierto que el análisis de estos SNP especificados permite la evaluación (diagnóstico predictivo) del riesgo de efectos secundarios inducidos por fármacos para varias enfermedades humanas, en particular el riesgo de inicio de granulocitopenia inducida por fármacos. La presente invención se ha conseguido sobre la base de este hallazgo.

35 La presente invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos y un procedimiento de detectar marcadores de polimorfismos genéticos empleados como índice para la determinación del riesgo mencionado anteriormente y describe oligonucleótidos y un kit empleado para estos procedimientos, que se resumen más adelante en (1) a (19).

40 (1) Un procedimiento para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos, en el que el procedimiento comprende detectar polimorfismos del gen IRS-2 humano de un sujeto y determinar la presencia del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos del sujeto mediante el uso de los polimorfismos genéticos como índice.

(2) Un procedimiento de detectar polimorfismos del gen IRS-2 humano de un sujeto para determinar la presencia del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos, en el que el polimorfismo genético se usa como índice.

45 (2) Un procedimiento como se ha descrito en (1) anteriormente, en el que los polimorfismos genéticos se detectan mediante al menos una técnica seleccionada del grupo que consiste en secuenciación directa de nucleótidos, análisis de transferencia de puntos de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), polimorfismo de la longitud completa del fragmento sometido a PCR con enzimas de restricción, ensayo invasor, PCR cuantitativa en peso real y un ensayo de polimorfismo genético empleando un espectrómetro de masas (ensayo de masas).

50 (3) Un procedimiento de examen del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos, que comprende detectar un polimorfismo del gen IRS-2 humano de un sujeto y llevar a cabo un examen usando los polimorfismos genéticos como índice del riesgo.

(4) Un procedimiento como se ha descrito en cualquiera de (1) a (3) anteriormente, en el que la presencia de la granulocitopenia inducida por fármacos se determina mediante el uso, como índice, de al menos un polimorfismo

genético seleccionado del grupo constituido por los polimorfismos del gen IRS-2 humano descritos a continuación en (a) a (f):

- (a) un polimorfismo que es conversión de C (Silvestre) en A en la posición 4.587 en 5' del codón de inicio de la traducción;
- 5 (b) un polimorfismo que es una delección de AT (Silvestre) en la posición 2.510 en 5' del codón de inicio de la traducción;
- (c) un polimorfismo que es conversión de A (Silvestre) en C en la posición 1.164 en 5' del codón de inicio de la traducción;
- 10 (d) un polimorfismo que es conversión de A (Silvestre) en G en la posición 15.870 en 3' del codón de inicio de la traducción;
- (e) un polimorfismo que es la conversión de A (Silvestre) en G en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción; y (f) un polimorfismo que es una delección de C (silvestre) en la posición 31.532 en 3' del codón de inicio de la traducción.
- 15 (5) Un procedimiento como se ha descrito en cualquiera de (1) a (4), en el que los polimorfismos genéticos se detectan mediante al menos una técnica seleccionada del grupo constituido por secuenciación directa de nucleótidos, análisis de transferencia puntual de oligonucleótidos específico de alelos (ASO), ensayo de extensión por cebadores de un solo nucleótido, análisis del polimorfismo de conformación de una sola hebra-PCR, análisis de polimorfismo de longitud del fragmento con enzimas de restricción (RFLP)-PCR, ensayo Invader, ensayo de PCR en tiempo real-cuantitativa y ensayo de polimorfismo genético usando un espectrómetro de masas (matriz de masas).
- 20 (6) Un procedimiento como se ha descrito en (5) anteriormente, en el que los polimorfismos genéticos se detectan mediante secuenciación nucleotídica directa.
- (7) Un procedimiento como se ha descrito en (5) anteriormente, en el que los polimorfismos genéticos se detectan mediante análisis del polimorfismo de longitud de fragmento (RFLP) de enzimas de restricción-PCR.
- 25 (8) Un procedimiento como se ha descrito en (7) anteriormente, en el que el análisis del polimorfismo de longitud de fragmento (RFLP) de enzimas de restricción con PCR se realiza mediante el uso de la enzima de restricción *Afa I* para detectar la conversión de A en G en la posición 29.793 en 3' desde el codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano.
- 30 (9) un oligonucleótido que puede hibridar con el gen IRS-2 humano y se emplea como cebador o sonda para la detección de polimorfismo genético, seleccionándose el oligonucleótido del grupo que consiste en oligonucleótidos descritos más adelante en de (a) a (f):
  - (a) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de C en A en la posición 4.587 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano;
  - (b) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es delección de AT en la posición 2.510 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano;
  - 35 (c) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en C en la posición 1.164 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano;
  - (d) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en G en la posición 15.870 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano;
  - 40 (e) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un sitio de polimorfismo genético que es la conversión de A en G en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano; y
  - (f) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es delección de C en la posición 31.532 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano
- 45 (10) Un oligonucleótido que puede hibridar con el gen IRS-2 humano y se emplea como cebador o sonda para la detección de polimorfismo genético, seleccionándose el oligonucleótido del grupo que consiste en oligonucleótidos descritos más adelante en de (a) a (d) y (f):
  - (a) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 3;
  - (b) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 6;
  - (c) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 9;
  - (d) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 12; y

(f) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 17

- 5 (11) Un kit para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos, en el que el kit comprende un oligonucleótido como se describe en (9) anteriormente que sirve como cebador o sonda para detectar un polimorfismo del gen IRS-2 humano.
- (12) Un kit como se ha descrito en (11) anteriormente, que comprende oligonucleótidos como se describe en (10) anteriormente.
- 10 (13) Un kit como se ha descrito en (11) anteriormente, que comprende oligonucleótidos como se describe en (e) de (9) anterior y la enzima de restricción *Afa* I, empleándose el kit para detectar la conversión de A en G en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano.
- (14) Un procedimiento como se ha descrito en (1) anteriormente, que evalúa el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos atribuida a la administración de vesnarinona mediante el uso de oligonucleótidos como se describe en (9) o (10) anteriormente.
- 15 (15) Un procedimiento como se ha descrito en (1) anteriormente, que evalúa el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos atribuida a la administración de vesnarinona mediante el uso de los oligonucleótidos como se describe en (1) de (9) anteriormente y la enzima de restricción *Afa* I.
- (16) Un kit para detectar un polimorfismo del gen IRS-2 humano empleado para determinar la presencia del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos, comprendiendo el kit oligonucleótidos como se ha descrito en (9) anteriormente como cebadores o sondas para detectar polimorfismos del gen IRS-2.
- 20 (17) Un kit como se ha descrito en (16) anteriormente, que comprende oligonucleótidos como se describe en (10) anteriormente.
- (18) Un kit como se ha descrito en (16) anteriormente, que comprende los oligonucleótidos como se describe en (e) de (9) anteriormente y la enzima de restricción *Afa* I, empleándose el kit para detectar la conversión de A en G en la posición 29.793 en 3' desde el codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano.
- 25 (19) Un procedimiento como se ha descrito en (2) anteriormente, que detecta un polimorfismo genético empleado para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos atribuida a la administración de vesnarinona mediante el uso de oligonucleótidos como se describe en (9) o (10) anteriormente.
- (20) Un procedimiento como se ha descrito en (2) anteriormente, que detecta un polimorfismo genético empleado para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos atribuida a la administración de vesnarinona mediante el uso de oligonucleótidos como se describe en (e) de (9) anteriormente y la enzima de restricción *Afa* I.
- 30 (21) Un procedimiento como se ha descrito en (3) anteriormente, en el que el examen se lleva a cabo sobre el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos atribuida a la administración de vesnarinona mediante el uso de oligonucleótidos como se describe en (9) o (10) anteriormente.
- 35 (22) Un procedimiento como se ha descrito en (3) anteriormente, en el que el examen se lleva a cabo sobre el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos atribuida a la administración de vesnarinona mediante el uso de oligonucleótidos como se describe en (e) de (9) anteriormente y la enzima de restricción *Afa* I.

#### Efectos de la invención

40 De acuerdo con la invención se proporcionan procedimientos para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano; un procedimiento de detectar un polimorfismo genético empleado como índice para la evaluación mencionada anteriormente; se describen kit para estos procedimientos; cebadores y sondas para la detección del polimorfismo, que se emplean en estos procedimientos; y un gen relacionado con un factor de riesgo para la granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano, particularmente útil para examinar o evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano antes de la administración de un fármaco que ha se ha notificado que induce granulocitopenia (incluida agranulocitosis). Estos son útiles para examinar o evaluar

45 el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano, particularmente útiles para examinar o evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano antes de la administración de un fármaco que ya se ha notificado que induce granulocitopenia (incluida agranulocitosis).

#### Breve descripción de las figuras

50 [Fig. 1] Representación esquemática que muestra la estructura del gen IRS-2 humano y las posiciones de los polimorfismos del gen.

**Mejor modo para llevar a cabo la invención**

Como se usa en el presente documento, las abreviaturas de los aminoácidos, los péptidos, las secuencias de nucleótidos, los ácidos nucleicos etc. se usan de conformidad con la nomenclatura de la IUPAC-IUB [IUPAC-IUB communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)], "Guideline for preparation of a specification, etc. including nucleotide sequences or amino acid sequences" (editado por la Oficina de patentes japonesa) y los símbolos de uso habitual usados en el campo.

Como se usa en el presente documento, la secuencia genómica del gen IRS-2 humano está incluida en la secuencia comunicada por Mohammadi, M. en el Sanger Center (número de registro en GenBank: AL162497), que tiene una longitud completa de 143.409 pb.

El gen IRS-2, cuya estructura se estima mediante la secuencia genómica sobre la base de los datos de secuencia de la secuencia del ARNm de IRS-2 obtenida en GenBank (número de registro XM 007095) y los datos de la secuencia de AL162497 mencionados anteriormente, es 32.730 pb compuesta por dos exones y un intrón. El gen IRS-2 corresponde a 96.673 a 126.402 pb en la secuencia de AL162497. La Fig. 1 muestra esquemáticamente la estructura del gen IRS-2. En la Fig. 1. "Ej. 1" y Ej. 2" corresponde a los dos exones mencionados anteriormente. Las abreviaturas con flechas corresponden a las alteraciones descritas más adelante (SNP). Es notable el hecho de que los SNP son sinónimos, es decir, los SNP no producen sustituciones de aminoácidos y, por tanto, la secuencia proteica no se va a cambiar. Los números de posición de los SNP como se describe en la especificación o la figura corresponden a los números de posición que cuentan desde A a ATG que se usa como codón para Met en el extremo N de la proteína cuando el ARNm se traduce en proteína (codón de inicio de la traducción).

conversión de C-4587A:C en A en la posición 4.587 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano;

delección de AT-2510:AT en la posición 2.510 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano;

conversión de A-1164C:A en C en la posición 1.164 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano; conversión de A15870G:A en G en la posición 15.870 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano;

conversión de A29793G:A en G en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano; y delección C31532del:C en la posición 31.532 (en el ej. 2) desde el codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" abarca ADN bicatenario, así como ADN monocatenario (hebra sentido o hebra antisentido) que constituye el ADN monocatenario o ADN bicatenario. A menos que es especifique lo contrario, el gen (ADN) empleado en la presente invención abarca ADN bicatenario, incluido ADN genómico humano, ADN monocatenario que incluye ADNc (hebra sentido), ADN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la hebra sentido, y fragmentos de los mismos. El gen mencionado anteriormente (ADN) puede incluir regiones reguladoras, regiones de codificación, exones e intrones. El término "polinucleótido" abarca ARN y ADN. El término "ADN" abarca ADNc, ADN genómico y ADN. Sintético. El término "polipéptido" abarca sus fragmentos, homólogos, derivados y mutantes. El término "mutante" se refiere a un mutante del alelo natural, un mutante que se produce de forma no natural, un mutante obtenido mediante alteración (delección, sustitución, adición o inserción) y una secuencia de polinucleótidos que no cambia sustancialmente la función del polipéptido codificado por la secuencia de polinucleótidos. La alteración de una secuencia de aminoácidos, que se puede producir de forma natural mediante, por ejemplo, mutación o modificación postraduccional, se puede realizar artificialmente introduciendo mutaciones en el gen.

Como se usa en el presente documento, el término "SNP (polimorfismo de un solo nucleótido)" se refiere a la alteración de un solo nucleótido en un gen o grupo de genes y "SNP" se refiere a la forma en plural. El término "haplotipo" se refiere al tipo de marcador monocatenario mencionado anteriormente construido de múltiples sitios polimórficos de una región génica continua o un grupo génico.

La presente invención se ha realizado en base al hallazgo de que un(os) polimorfismo(s) que incluyen la alteración en un sitio específico del gen IRS-2 humano (la totalidad del gen IRS-2, incluida la región promotora implicada en la regulación transcripcional), en particular el SNP o los SNP están estrechamente correlacionados con la granulocitopenia inducida por fármacos y el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos se puede evaluar (prediagnóstico) detectando los SNP como marcador de polimorfismo genético en el sitio específico. El procedimiento de evaluación de la presente invención implica la detección de un(os) polimorfismo(s) (es decir SNO) del gen IRS-2 humano de una muestra (derivada de un sujeto).

Los SNP detectados y analizados mediante el procedimiento de la presente invención (es decir, alteraciones genéticas que sirven como índice para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos) incluyen seis polimorfismos mencionados anteriormente; es decir C-4587A, AT-2510del, A-1164C, A15870G, A29793G, and C31532del. Las posiciones de lo SNP en el gen IRS-2 como se muestran en la Fig. 1. Es notable que los números de posición de los SNP corresponden a los números de posición que cuentan desde A a ATG que se usa como

codón para Met en el extremo N de la proteína cuando el ARNm se traduce en proteína (codón de inicio de la traducción).

La presente invención permite la detección de polimorfismos (SNP y haplotipo) del gen IRS-2 humano, que proporciona datos o medios útiles para aclarar y entender el mecanismo de la granulocitopenia inducida por fármacos en seres humanos y para el diagnóstico y prevención de la enfermedad. De acuerdo con la presente invención, cuando se determina un sujeto que tiene el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos y se evita la administración de un fármaco al sujeto, se puede prevenir la granulocitopenia inducida por fármacos. Además, cuando se realizan otros ensayos con frecuencia además de la presente invención para monitorizar los efectos secundarios tras la administración de un fármaco, se pueden tomar medidas eficaces contra dichos efectos secundarios.

El procedimiento de la presente invención se describirá con detalle a continuación. En el procedimiento de la presente invención se detectan los polimorfismos del gen IRS-2 humano y la presencia del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos se determina mediante el uso de polimorfismos genéticos como índice. La detección de los polimorfismos del gen IRS-2 humano se realiza mediante, por ejemplo, el procedimiento siguiente: Se prepara la secuencia genómica del gen IRS-2 humano de un sujeto, o su hebra complementaria, y, si se desea se determina la secuencia genómica o su hebra complementaria, seguido de la detección de los polimorfismos génicos.

#### Preparación del gen IRS-2 humano que incluye SNP

El gen IRS-2 humano derivado de un sujeto se prepara como muestra para un análisis de ADN. Ejemplos específicos del gen que tiene polimorfismos (SNP) son como se ha descrito anteriormente. El gen IRS-2 humano abarca la hebra complementaria de ejemplo anterior de la secuencia de ADN del gen IRS-2 humano.

El gen IRS-2 humano, que tiene polimorfismos genéticos, o su hebra complementaria, se puede preparar fácilmente mediante una técnica de ingeniería genética empleada habitualmente en base a los datos de secuencia específica del gen IRS-2 humano, como se divulga en el presente documento [véase, por ejemplo, Molecular Cloning 2ª Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); o Zoku Seikagaku Jikken Koza "Idenshi Kenkyuho I, II, III" editado por The Japanese Biochemical Society (1986)].

Específicamente, mediante un procedimiento conocido, se extrae el DNDC o ADN genómico de un sujeto (p. ej., un paciente con granulocitopenia inducida por fármacos que tiene SNP del gen IRS-2 humano) y se selecciona un clon diana mediante un procedimiento habitual que emplea, por ejemplo, un anticuerpo, enzima de restricción o sonda adecuado, que puede incluir un polimorfismo del gen IRS-2 humano [véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 78, 6613 (1981); o Science, 222, 778 (1983)], para preparar de este modo una secuencia genómica diana del gen IRS-2.

Ejemplos de la fuente del ADNc o ADN genómico mencionados anteriormente incluyen varias células y tejidos que tienen el gen IRS-2 que incluye SNP y células cultivadas derivadas del mismo. Otros ejemplos de la fuente incluyen fluidos corporales, como sangre (p. ej., suero o plasma), saliva, linfa, moco de las vías respiratorias, orina y semen. El material fuente mencionado anteriormente (que sirve como muestra) es, preferentemente, ADN o ADN genómico derivado de un sujeto humano antes de la administración de un fármaco (en concreto, un fármaco que anteriormente se ha notificado que induce granulocitopenia). El aislamiento del ARN de dicho material fuente, el aislamiento y la purificación del ARNm, la preparación del ADNc, la clonación del mismo, etc., se pueden llevar a cabo mediante un procedimiento habitual. En la presente invención se pueden usar varias bibliotecas de ADNc disponibles comercialmente (p. ej., bibliotecas de ADNc disponibles en Clontech Lab. Inc.).

No reimpone ninguna limitación concreta al procedimiento de detección selectiva de un gen diana de las bibliotecas de ADNc y la detección selectiva se puede realizar mediante un procedimiento habitual. Específicamente, se prepara una sonda que incluye un sitio polimórfico que puede unirse selectivamente a la secuencia de ADN de la secuencia diana alrededor de los SNP, e hibridación de placas, hibridación de colonias etc. Estos procedimientos se realizan por sí solos o en combinación mediante el uso de la sonda preparada de este modo.

Los cebadores empleados para la detección selectiva pueden ser un cebador directo o un cebador inverso diseñados sobre la base de los datos de la secuencia de nucleótidos diana del gen IRS-2 humano. Dichos cebadores se pueden sintetizar mediante un procedimiento habitual mediante el uso de, por ejemplo, un aparato de síntesis adecuado. En general, la sonda para la detección selectiva es una sonda marcada. No obstante, la sonda para la detección selectiva puede ser una sonda sin marcar, siempre que se pueda unir específicamente a un reactivo marcado directa o indirectamente. El reactivo de marcaje y la técnica de marcaje, tal como una sonda o ligando, ya se conocen en el campo. Ejemplos del reactivo de marcaje incluyen reactivos de marcaje radioactivo, biotina, pigmentos fluorescentes, reactivos quimioluminiscentes, enzimas (p. ej., luciferasa) y anticuerpos, que se pueden incorporar mediante una técnica de marcaje conocida, como traducción en muescas, cebado aleatorio o tratamiento con quinasa.

El ADN genómico o ARNm extraídos de este modo, incluido el gen IRS-2 humano, se puede amplificar a través de un procedimiento de amplificación génica. Esta amplificación génica permite una detección precisa y más fácil

mediante el procedimiento de detección de la presente invención. Ejemplos del procedimiento de amplificación génica incluyen PCR (Saiki, R. K., Bugawan, T L., y col., Nature, 324,163-166 (1986)), NASBA (Comptom, J., Nature, 650, 91-92 (1991)), TMA (Kacian, D. L., and Fultz, T J., patente de EE.UU. 5.399.491 (1995)), y SDA (Walker, G. T, Little, M. C., y col., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 89, 392-396 (1992)).

- 5 Los fragmentos génicos amplificados por medio de, por ejemplo, PCR se pueden aislar y purificar mediante una técnica frecuente, tal como electroforesis en gel. Como alternativa, la purificación de dichos fragmentos génicos se puede realizar mediante el uso de una columna. La purificación del fragmento génico se puede confirmar mediante, por ejemplo, espectrometría de masas. De acuerdo con las propiedades de los fragmentos génicos amplificados de este modo, los fragmentos génicos se aplican para la detección del gen IRS-2 humano (SNP) empleados en la  
10 presente invención.

#### Detección de los polimorfismos del gen IRS-2 humano

En el procedimiento de la presente invención, después se detecta la presencia de un(os) polimorfismos de la muestra mencionada anteriormente. Específicamente, esta detección se puede realizar mediante, por ejemplo, cualquiera de los procedimientos descritos más adelante (1) a (8).

#### 15 (1) Secuenciación directa de nucleótidos

- La detección del (los) polimorfismo(s) del gen IRS-2 se puede realizar mediante secuenciación directa de los nucleótidos, que habitualmente se ha empleado para secuenciar dicho gen; por ejemplo, el procedimiento de dideoxi (Sanger, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463-5467 (1977)) o el método de Maxam-Gilbert [Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)]. La detección del polimorfismo genético se puede realizar mediante una  
20 combinación de dicho procedimiento de secuenciación directa de los nucleótidos y un procedimiento de amplificación de ADN (p. ej., PCR). En particular, se prefiere una combinación de dicho procedimiento de secuenciación directa de los nucleótidos y PCR o un procedimiento de amplificación de ADN similar, ya que esta combinación solo necesita una cantidad pequeña de una muestra de ADN y permite la detección simple y sencilla con una sensibilidad y una precisión altas.

- 25 Básicamente, este procedimiento preferido se puede realizar mediante, por ejemplo, el procedimiento siguientes: Un fragmento de gen amplificado por PCR o un producto purificado del mismo se clona en un plásmido, seguido de secuenciación directa de nucleótidos mediante el procedimiento dideoxi, el método de Maxam-Gilbert o un procedimiento similar. Por comodidad, el procedimiento preferido se puede realizar mediante secuenciación de nucleótidos mediante el uso de, por ejemplo, un kit de secuenciación disponible comercialmente. Por tanto, se puede  
30 detectar la presencia de polimorfismos en los sitios específicos mencionados anteriormente del gen IRS-2 humano.

- En el procedimiento mencionado anteriormente y en los procedimientos que se describen más adelante, no se impone ninguna limitación concreta al fragmento de ADN amplificados por PCR (es decir, la muestra), siempre que el fragmento de ADN incluya al menos uno de los sitios específicos mencionados anteriormente en los que cabe esperar que se produzcan polimorfismos. En general, el fragmento de ADN tiene una longitud de aproximadamente  
35 50 a varios miles de pb, preferentemente de 50 a varios cientos de pb.

#### (2) Procedimiento de transferencia puntual de oligonucleótidos específicos de alelo

- Como alternativa, la detección del o los polimorfismos del gen IRS-2 se puede realizar mediante el procedimiento de transferencia puntual de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) Conner, B. J., y col., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S .A. , 80, 278-282 (1983)). Este procedimiento se puede realizar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia puntual en el que el fragmento génico amplificado por PCR mediante el uso de un cebador directo o cebador inverso  
40 diseñados para formar un sándwich con la diana, se hibrida con una sonda de oligonucleótidos específicos de alelo que contiene el sitio del SNP. Por tanto, se puede determinar la presencia de Ans en el fragmento génico.

#### (3) Ensayo de extensión del cebador nucleotídico sencillo

- La detección del o los polimorfismos del gen IRS-2 se puede también realizar mediante un ensayo de extensión de un solo nucleótido, tal como el ensayo SNaPshot, pirosecuenciación o el ensayo de detección de mutación puntual, una sonda diseñada para corresponder a un nucleotide inmediatamente (o varios nucleótidos) antes de un polimorfismo Diana (SNP) (es decir, una sonda diseñada de modo tal que el extreme 3' de la misma corresponde a uno (o varios nucleótidos en 5' del polimorfismo) se hibrida con una muestra de ADN. Cada uno de los ensayos  
45 mencionados anteriormente se puede realizar mediante el uso de un kit de detección de SNP disponibles comercialmente en el software del kit.

Por ejemplo, el ensayo SNaPshot se puede realizar mediante el uso del kit de extensión de cebadores ABI PRISM SNaPshot ddNTP. La detección de los SNP se puede realizar mediante fragmentos de detección y de fluorescencia generados tras la reacción mediante el uso ABI PRISM 31 0/377/31 00/3700 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems) y el software.

- 55 La pirosecuenciación se puede realizar mediante, por ejemplo, los procedimientos siguientes: Específicamente, el



ADN genómico se aísla de, por ejemplo, una muestra de sangre a través de un procedimiento habitual, varias decenas de varios cientos de nucleótidos (incluido un polimorfismo) se amplifican mediante PCR mediante el uso de un cebador marcado con biotina, el ADN monocatenario se purifica mediante el uso de perlas magnéticas y el ADN purificado de este modo se emplea como muestra. Un cebador diseñado para tener una secuencia complementaria correspondiente a varios nucleótidos en 5' de un polimorfismo diana se hibrida con la muestra y, después, cada dNTP se añade a la mezcla uno tras otro de acuerdo con la secuencia en las proximidades de la entrada del polimorfismo en el software. El ácido pirofosfórico (PPi) liberado de la extensión de nucleótidos de la ADN polimerasa se convierte en ATP mediante ATP sulfurilasa y la luciferasa genera luz detectable usando este ATP, que se puede detectar con un detector de quimioluminiscencia, una cámara de CCD etc. Por tanto, se puede realizar el genotipado mediante análisis del pico de quimioluminiscencia obtenido mediante la adición de los dNTP. Este procedimiento permite el genotipado en aproximadamente 15 minutos para 96 muestras.

El procedimiento mencionado anteriormente puede usar un reactivo y un aparato empleado generalmente. Ejemplos incluyen reactivos tales como kit de reactivos para SNP disponibles comercialmente (Pirosecuenciación AB) que contienen como componentes una mezcla de las cuatro enzimas siguientes: ADN polimerasa, ATP-sulfurilasa, luciferasa y apirasa, una solución sustrato que contiene luciferina y APS (adenosina-5'-fosfosulfato) y dNTP que contienen dATP (desoxiadenosina-5'-trifosfato), dCTP, dGTP y dTTP; sistema PSQ96 para análisis automático de la secuencia de ADN (Pirosecuenciación AB); y el software SNP empleado para el análisis (Pirosecuenciación AB).

Como alternativa, la pirosecuenciación se puede realizar mediante, por ejemplo, el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. nº 6,159,693. Específicamente, un AND genómico aislando se amplifica; el producto de PCR amplificado de este modo se purifica y el producto resultante se hace reaccionar con ácido pirofosfórico mediante el uso de READIT™ System (Promega Corporation), seguido del análisis de los datos resultantes.

#### (4) Análisis del polimorfismo de conformación monocatenario por PCR (SSCP)

El procedimiento de detección de la presente invención puede emplear el procedimiento PCR-SSCP (Orita, M., Iwahara, H., y col., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 2776-2770 (1989)), en el que un producto amplificado por PCR (AND monocatenario) se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizado, y la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido se determina en base a las diferencias de movilidad.

#### (5) Análisis del polimorfismo de longitud de fragmento con enzimas de restricción-PCR (RLFP)

En la presente invención, en el caso en el que, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que incluye un polimorfismo, que están dirigidos a la detección de SNP o haplotipos del gen IRS-2 humano, contiene un sitio de reconocimiento de encimas de restricción, la detección se puede realizar mediante análisis del polimorfismo de longitud de fragmento con enzima de restricción (análisis RFLP: Botstein, D. R., y col., Am. J. Hum. Gen., 32, 314-331 (1980)).

Específicamente, por ejemplo, se emplea una enzima de restricción que puede reconocer nucleótidos alrededor del polimorfismo, con el fin de detectar si el nucleótido en la posición 29.793 es A (silvestre) o G (mutante), contándose la posición desde el codón de inicio de la traducción presente en el Ej. 2 de gen IRS-2 humano. La enzima empleada en el análisis RFLP puede ser cualquier enzima de restricción, siempre que la enzima pueda reconocer nucleótidos alrededor de los polimorfismos diana. Ejemplos específicos de la enzima de restricción incluyen *Afa* I.

El análisis RFLP se realiza, más preferentemente, como análisis PCR-RLFP; es decir, el análisis se realiza con una gran cantidad de ADN que se ha amplificado y preparado con antelación mediante PCR o modificación de la misma. Por tanto, se puede detectar la presencia de polimorfismos en base a la presencia de un sitio de escisión específico.

Más específicamente, la detección de SNP del gen IRS-2 humano mediante PCR-RFLP se realiza mediante, por ejemplo, el procedimiento siguiente: En primer lugar, el ADN genómico del gen IRS-2 humano se extrae de una muestra biológica humana y un fragmento de ADN de la región que incluye un polimorfismo del gen se amplifica, de modo que se prepara una cantidad grande de una muestra de ADN. El cebador directo t/o cebador inverso que se van a emplear pueden ser un cebador cuta secuencia no es completamente idéntica a la secuencia genómica, siempre que sea un cebador que contiene una secuencia para introducir un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción. Posteriormente, la muestra de ADN amplificada anteriormente se digiere mediante el uso de una enzima de restricción específica (Es decir, una enzima que puede digerir un tipo silvestre o mutante) y patrones de escisión de ADN (p. ej., la presencia de escisión o la longitud de bases de los fragmentos escindidos) se confirman mediante un procedimiento habitual, tal como electroforesis en gel.

En el caso del polimorfismo (A29793G) del gen IRS-2 humano especificado por la presente invención, que está asociado con la granulocitopenia inducida por fármacos en el ser humano, el SNP genera un sitio de reconocimiento específico (GTAC) de la enzima de restricción *Afa* I en la región que incluye las posiciones 29.793 a 29.796 de la secuencia de nucleótidos del gen IRS-2 humano. Por tanto, este polimorfismo se puede detectar mediante el análisis RFLP.

(6) Ensayo Invader

También se puede realizar la detección de SNP del gen IRS-2 a través del ensayo Invader. El ensayo Invader se puede realizar con referencia a las publicaciones siguientes.

. Lyamichev, V., y col., Nat. Biotechnol., 17(3) 292-296 (1999); y

. Publicación [de patente internacional WO 9823774 (publicación de patente Kohyo japonesa nº 2001-526526).

5 El ensayo Invader permite el análisis de los SNP de ADN genómico sin amplificación del ADN diana. Por ejemplo, el ensayo Invader se realiza del siguiente modo.

10 Con el fin de detectar la presencia de SNP diana del gen IRS-2 humano, primero se aísla el ADN genómico. Para realizar este ensayo se prepararon dos oligonucleótidos mediante el uso de, por ejemplo, un aparato de síntesis de síntesis de ADN automático. Un oligonucleótido, la sonda específica del alelo, contiene la base complementaria del nucleótido de SNP que se va a analizar y se extiende en 5' del SNP. A esta sonda se añadieron en 5' los nucleótidos no complementarios adicionales, que están compuestos por de 15 a 50 nucleótidos (ala 5'). El segundo oligonucleótido que tienen de 15 a varias decenas de nucleótidos, la sonda oligonucleotídica Invader tiene una secuencia complementaria a la 3' del SNP y el extremo de la sonda es una base no apareada que se solapa con el nucleótido SNP que se va a analizar. Los dos oligonucleótidos y una enzima (es decir, Cleavase para el ensayo 15 Invader empleado en la presente invención) se añaden al ADN genómico diana, que se extrae de lo descrito anteriormente. Esta enzima reconoce la estructura específica compuesta por los dos oligonucleótidos y el ADN genómico diana. Esta mezcla de reacción se hace reaccionar en las condiciones adecuadas. Cuando el ADN genómico de una muestra tiene un SNP diana, procede una primera reacción; la enzima escinde el ala en 5'. Por otro lado, cuando el ADN genómico de una muestra no tiene un SNP diana, la enzima no lo escinde.

20 El ala en 5' liberada de la sonda específica del alelo que la enzima ha escindido está unida de forma complementaria a una sonda de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) que sirve como diana y el extremo 3' del ala en 5' está invadida por la sonda FRET. De un modo similar al descrito anteriormente se produce la reacción enzimática (segunda reacción) y se libera un pigmento fluorescente. La sonda FRET empleada en esta segunda reacción se forma de un modo tal que no depende de una diana que se va a detectar y contiene los 25 siguientes dos elementos esenciales:

(1) una región en 3' que es complementaria a un producto escindido a través de la primera reacción; y

(2) una región autocomplementaria que forma un dúplex para simular una sonda monocatenaria, que se hibrida con una diana y que contiene un pigmento fluorescente indicador y un pigmento fluorescente inactivador.

30 Cuando el pigmento fluorescente indicador y el pigmento fluorescente inactivador están unidos a la misma sonda, la intensidad de fluorescencia del pigmento fluorescente indicador se inactiva mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Mientras que el pigmento fluorescente indicador y el pigmento fluorescente inactivador no están unidos a la misma sonda, la intensidad de fluorescencia del pigmento fluorescente indicador no se inactiva. Cuando el ala en 5' liberada de la primera sonda escindida se hibrida con la sonda FRET, el producto resultante actúa como un oligonucleótido invasor en la segunda reacción y se produce un complejo de invasión que es 35 reconocido por la enzima. Por tanto, la escisión de la sonda FRET por la enzima mencionada anteriormente separa los dos pigmentos fluorescentes, de modo que da una señal fluorescente detectable. La señal se puede leer mediante el uso de, por ejemplo, un lector de placas de microtitulación de fluorescencia estándar, de modo que se puede detectar la presencia de SNP diana. Una combinación de las reacciones primera y segunda puede amplificar la señal por un factor de  $1 \times 10^6$ . El uso de dos sondas FRET que tienen pigmentos fluorescentes diferentes también 40 permite la detección de la presencia de SNP.

(7) Ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real

También se puede realizar la detección de polimorfismos del gen IRS-2 a través del ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real. Este ensayo se puede realizar mediante, por ejemplo, el procedimiento siguiente. Específicamente, en 45 primer lugar, para confirmar la presencia de un polimorfismo se prepara un fragmento de ADN como cebador directo o cebador inverso formado por, por ejemplo, de 15 a 39 nucleótidos. En este caso, el cebador directo o cebador inverso se prepara de modo que no contenga los polimorfismos. Posteriormente se prepara una sonda que tiene el pigmento fluorescente indicador y un pigmento fluorescente inactivador y la sonda contiene, por ejemplo, un oligonucleótido de 15 a 50 pb que corresponde a una secuencia parcial del fragmento amplificado. La secuencia de nucleótidos de la sonda se tiene que seleccionar de modo que no hibrida una región con tanto el cebador directo como el inverso. La sonda está diseñada de modo que tenga una secuencia complementaria a una secuencia 50 específica del alelo para detectar la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido diana. Mediante el uso de la sonda, un fragmento de ADN diana del gen IRS-2 de una muestra que se va a detectar se amplifica mediante PCR y fluorescencia a partir de la mezcla de reacción resultante se mide en tiempo real. Por tanto, se puede detectar la presencia del polimorfismo. El uso de dos sondas que tengan dos pigmentos fluorescentes también permite la 55 detección de ambos alelos.

El pigmento fluorescente indicador usado en el ensayo Invader mencionado anteriormente o ensayo TaMan es, preferentemente, un pigmento fluorescente de fluoresceína como FM (6-carboxi-fluoresceína), mientras que el

pigmento fluorescente inactivador es, preferentemente, un pigmento fluorescente de rodamina, tal como TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina). Estos pigmentos fluorescentes se conocen y están contenidos en los kits de detección de PCR en tiempo real disponibles comercialmente. En la presente invención se puede usar dicho pigmento fluorescente disponible comercialmente. No se impone ninguna limitación concreta en la posición de unión del pigmento fluorescente indicador ni del pigmento fluorescente inactivador, pero, en general, el pigmento fluorescente indicador está unido a un extremo (preferentemente el extremo 5') del nucleótido que constituye la sonda y el pigmento fluorescente inactivador está unido al otro extremo. El procedimiento para unir un pigmento fluorescente a un oligonucleótido se conoce y se describe en, por ejemplo, Noble, y col., (1984), *Nuc. Acids Res.*, 12: 3387-3403 o Iyer, y col., (1990), *J. Am. Chem. Soc.*, 112: 1253-1254.

10 El ensayo TaqMan *per se* es conocido y los aparatos y kit para el ensayo TaqMan están disponibles comercialmente. En la presente invención se puede usar dicho aparatos o kit disponible comercialmente. Por ejemplo, el ensayo TaqMan se puede realizar de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente japonesa nº 2.285.976 o de acuerdo con el manual de usuario del sistema de secuenciación ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems).

15 (8) Ensayo de polimorfismo genético usando un espectrómetro de masas (matriz de masas)

El ensayo de matriz de masas detecta la diferencia en el peso molecular entre polimorfismos. Específicamente, una región que incluye un polimorfismo que se va a detectar se amplifica mediante PCR y, después, se hibrida un cebador de extensión con una secuencia inmediatamente antes de la posición del SNP, seguido de una reacción de extensión mediante el uso de una mezcla de reacción que contiene una mezcla de ddNTP/dNTP (p. ej., una mezcla de reacción que contiene ddATP, dCTP, dGTP, y dTTP), de modo que da un fragmento que tiene una longitud dependiendo del tipo de SNP. El fragmento resultante se purifica y después se somete a análisis mediante el uso de, por ejemplo, espectrómetro de masas MALDI-TOFF, de modo que la relación entre el peso molecular y el polimorfismo genético se pueda analizar (Pusch, W., Wurmbach, JH., Thiele, H., Kostrzewa, M., MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping, *Pharmacogenomics*, 3 (4): 537-48 (2002)). Este ensayo se puede realizar fácilmente mediante el uso de, por ejemplo, el sistema de análisis de SNP de alto rendimiento Sequenom Mass ARRAY ([http://www.sequenom.com/Files/applications/hme\\_assay.html](http://www.sequenom.com/Files/applications/hme_assay.html)).

(9) Otros procedimientos de detección

La detección de lo SNP del gen IRS-2 también se puede realizar mediante, por ejemplo, cualquiera de los diversos procedimientos descritos más adelante que convencionalmente se han conocido como procedimientos de secuenciación de ADN o procedimientos de detección de mutaciones.

(a) Procedimiento PCR-SSO que usa oligonucleótido específico de secuencia

Un procedimiento en el que una sonda para una mutación se inmoviliza en un transportador; una muestra (producto amplificado génico) se hibrida con la sonda; y una diferencia en la eficiencia de hibridación se determina en base a la presencia de apareamiento erróneo.

(b) Procedimiento PCR-SSP para la detección de mutaciones puntuales

Un procedimiento mediante el uso de un cebador específico de secuencia para amplificación génica que está diseñado de un modo tal que un nucleótido correspondiente a una mutación puntual se convierte en el nucleótido en el extremo 3', en el que el procedimiento usa que se produce una diferencia significativa en la eficiencia de la amplificación por PCR en función del nucleótido en el extremo 3' del cebador.

(c) PCR-DGGE (electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización)

Cuando un fragmento de ADN que incluye una mutación hibrida con un fragmento de ADN normal y, después, el producto hibridado de este modo se somete a electroforesis en un gel de poliacrilamida con un desnaturalizante (p. ej., urea o formamida) a concentraciones gradualmente crecientes, el producto se convierte en fragmentos de ADN monocatenarios en una posición de concentración menor del desnaturalizante en comparación con el caso de los fragmentos de ADN bicatenario homogéneo sin apareamiento erróneo. Los fragmentos de ADN monocatenario migran a una velocidad más alta que la velocidad de migración de los -fragmentos de ADN bicatenario y, por tanto, se puede detectar una mutación en un solo nucleótido mediante comparación de las movilidades de los fragmentos de ADN.

(d) Procedimiento de pinzamiento PCR-DGGE/GC (Sheffield, V. C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 232-236 (1989)).

Este procedimiento es una modificación de la PCR-DGGE mencionada anteriormente en el que la región que tiene un contenido en GC alto se añade a un fragmento de ADN diana para la detección de una mutación. Este procedimiento compensa la desventaja de la PCR-DGGE en la detección de sustitución, delección, adición o inserción de múltiples nucleótidos. Este procedimiento requiere una etapa de añadir una pinza de GC a un fragmento de ADN diana para la detección de mutación.

(e) Ensayo de protección con ARNasa (Finkelstein, J., y col., Genomics, 7, 167-172 (1990))

(f) RT-PCR in situ (Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993))

(g) Hibridación in situ

5 (h) Transferencia de tipo Southern (Sambrook, J., y col., Molecular Cloning a Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY. (1989))

(i) Ensayo de hibridación de punto (véase, por ejemplo, Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98: 503-517 (1975))

(j) Hibridación de fluorescencia (FISH: Takahashi, E., y col., Hum. Genet., 86, 1416 (1990))

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

10 (l) Procedimiento que usa un clon del vector del cromosoma artificial de levadura (YAC) como sonda (Lengauer, C., y col., Cancer Res., 52, 2590-2596 (1992)).

Por tanto, se pueden detectar los polimorfismos (SNP) o el haplotipo del gen IRS-2 humano.

15 De acuerdo con la presente invención, cuando se confirma que una muestra de prueba tiene un polimorfismo(s) del gen IRS-2 mediante procedimientos de detección descritos anteriormente, se considera la muestra como sujeto con un alto riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos.

Por tanto, antes de administrar un fármaco, se determina si el sujeto tiene un riesgo alto de granulocitopenia inducida por fármacos. Por tanto, la granulocitopenia atribuida a la administración de fármacos o a otras causas se podrá evitar mediante esta prueba.

20 Particularmente, la detección de SNP del gen IRS-2 humano de acuerdo con la presente invención es eficaz en la detección de la presencia de un factor de riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano. Es decir, la detección selectiva de los SNP permite la detección de un factor de riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de detectar un polimorfismo(s) del gen IRS-2 humano de un sujeto que puede desarrollar granulocitopenia inducida por fármacos. Es decir, el(los) polimorfismo(s) genéticos del gen IRS-2 humano se puede usar como índice para detectar un sujeto  
25 que desarrolla granulocitopenia inducida por fármacos.

#### Oligonucleótido

30 La presente invención también proporciona un oligonucleótido que sirve como cebador o sonda para la detección de polimorfismo genético, que se usa en el procedimiento de evaluación (detección) de la presente invención usando PCR. No se impone ninguna limitación concreta sobre el oligonucleótido, siempre que se pueda amplificar específicamente una región específica que incluya polimorfismos (SNP) del gen IRS-2 humano. El oligonucleótido se puede construir adecuadamente en base a los datos de la secuencia del gen IRS-2 humano y sintetizarse mediante procedimientos frecuentes.

35 Más específicamente, el oligonucleótido se puede sintetizar mediante un procedimiento de síntesis química usado generalmente, tal como el procedimiento de fosfoamidita o el procedimiento de fosfotriéster, o se puede sintetizar mediante el uso de un aparato automático de síntesis de oligonucleótidos disponible comercialmente, tal como Pharmacia LKB Gene Assembler Plus (producto de Pharmacia). Un fragmento bicatenario se puede obtener hibridando un oligonucleótido monocatenario sintetizado químicamente y su hebra complementaria en las condiciones adecuadas, o sintetizarse usando un cebador adecuado y la ADN polimerasa.

40 Ejemplos preferidos del oligonucleótido mencionado anteriormente que sirve como sonda o cebador incluyen oligonucleótidos parciales correspondientes a un fragmento de ADN diseñado para contener un polimorfismo del gen IRS-2 humano. Estos oligonucleótidos tienen al menos una secuencia de 10 bases (en general, aproximadamente de 10 a 35 secuencia de bases). El oligonucleótido como par de cebadores puede ser oligonucleótidos que tienen dos secuencias que están diseñadas y sintetizadas para formar un sándwich de SNP del gen IRS-2 humano (secuencia genómica). El oligonucleótido que sirve como sonda puede ser su clon positivo per se.

45 Ejemplos preferidos del oligonucleótido mencionado anteriormente que sirve como sonda o cebador incluyen secuencias parciales correspondientes a un fragmento de ADN diseñado para contener al menos uno de los siguientes polimorfismos: Conversión de C a A en la posición 4.587 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano (C-4587A) ; delección de AT en la posición 2.510 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano (AT-251 Odel) ; conversión de A en C en la posición 1.164 en 5' del codón de inicio de la traducción  
50 del gen IRS-2 humano (A-1164C) ; conversión de A en G en la posición 15. 870 del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano (A15870G); conversión de A en G en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano (A29793G); y delección de C en la posición 31.532 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano (C31532del). Este cebador o sonda tiene al menos una secuencia de 10 bases

(preferentemente al menos una secuencia de 15 bases).

Ejemplos específicos del oligonucleótido incluye cebadores directos y cebadores inversos de las SEC ID N° 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11 y 13 a 16, y cebadores oligonucleotídicos para secuenciación directa de las SEC ID N° 3, 6, 9, 12 y 7, que se describen más adelante en los Ejemplos.

- 5 No se impone una limitación concreta en la sonda específica del gen empleada en la presente invención, siempre que se pueda detectar cualquiera de los C-4587A, AT-251 Odel, A-1164C, A15870G, A29793G, y C31532del mencionados anteriormente.

Kit de evaluación

- 10 El procedimiento de evaluación (detección) de la presente invención puede realizarse más fácilmente mediante el uso de un kit de reactivos para detectar SNP del gen IRS-2 humano de una muestra. La presente invención también proporciona un kit para dicha evaluación

- 15 Un kit de la presente invención incluye, como componente esencial, al menos un fragmento de ADN que hibrida con una secuencia nucleotídica parcial o completa o sus secuencias complementarias, incluidos seis SNP del gen IRS-2 o que hibrida con una secuencia que contiene un oligonucleótido con una base o varias bases antes de un sitio polimórfico. Otro kit incluye, como componente esencial, una enzima de restricción (p. ej., *Afa I*) que reconoce específicamente una secuencia formada de varios nucleótidos (incluido el sitio polimórfico mencionado anteriormente).

- 20 Otros componentes del kit de la presente invención son, por ejemplo, un reactivo de marcaje, y reactivos requeridos para PCR (p. ej., ADN polimerasa Taq, desoxinucleótido trifosfato o un cebador para amplificación de ADN). Ejemplos del reactivo de marcaje incluye sustancias de modificación química, tales como un isótopo radioactivo, una sustancia emisora de luz y una sustancia fluorescente. El fragmento de ADN per se puede conjugarse con antelación con dicho reactivo de marcaje. El kit puede incluir además, por ejemplo, diluyentes de reacción adecuados, anticuerpos estándar, tampones, detergentes o soluciones de detección de la reacción, para realizar la medida de forma conveniente.

- 25 El uso del procedimiento de evaluación mencionado anteriormente de la presente invención permite la provisión de un procedimiento de exploración del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos mediante el uso, como índice, de un polimorfismo genético detectado que puede producir granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano, particularmente un procedimiento de exploración del riesgo de granulocitopenia atribuida a la administración de un fármaco (p. ej., vesnarinona) que ya se ha notificado que induce granulocitopenia (incluida agranulocitosis) antes de la administración del fármaco, así como un reactivo diagnóstico y un kit diagnóstico empleados para dicho procedimiento de exploración.

- 30 La presente invención se describirá a continuación con detalle mediante Ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de la invención.

Ejemplo 1

- 35 Ejemplo 1

(a) Detección selectiva de polimorfismo genético en relación con granulocitopenia atribuida a la administración de fármacos

- 40 Con el fin de encontrar polimorfismos genéticos en relación con la granulocitopenia atribuida a la administración de fármacos se usaron sujetos que habían recibido vesnarinona (3,4-dihidro-6-[4-(3,4-dimetoxibenzoil)-1-piperazinil]-2(1H)-quinolina). En Japón, se ha notificado que la vesnarinona, que es un fármaco disponible comercialmente aplicable a la insuficiencia cardíaca crónica (insuficiencia cardíaca de leve a moderada) induce efectos secundarios, incluidos leucopenia, granulocitopenia y agranulocitosis, y, por tanto, la administración de este fármaco requiere observación de dichos efectos secundarios y análisis frecuentes de los granulocitos. Entre los sujetos que habían recibido vesnarinona, habían acordado oralmente colaborar en la investigación de la causa de la granulocitopenia inducida por vesnarinona entre mayo de 1991 y octubre de 1996 y habían aceptado proporcionar una muestra de sangre, se usaron 85 sujetos (proporción varones/mujeres= 1,21: 1) que habían acordado de nuevo por escrito colaborar en el análisis genético de acuerdo con las guías éticas entre julio de 2001 y diciembre de 2001. El ADN genómico se extrajo de una muestra de sangre (o una muestra celular derivada de la misma) de cada uno de los sujetos que de nuevo habían aceptado como se ha descrito antes mediante un procedimiento habitual y se usó para las pruebas descritas más adelante.

(b) Criterios de clasificación de los sujetos

En base a los criterios que se describen más adelante, los sujetos se clasificaron en los dos grupos siguientes: Un grupo de sujetos con granulocitopenia y un grupo de sujetos sin granulocitopenia. Entre los sujetos, los sujetos que tenían leucocitos o neutrófilos que habían disminuido a la mitad o menos tras la administración de vesnarinona y que

tienen el número de leucocitos de  $2.000/\text{mm}^3$  o menor, o el número de neutrófilos de  $1.000/\text{mm}^3$  o menor, se clasificaron como “sujetos con granulocitopenia”. Por otro lado, los sujetos en los que no había disminuido el número de neutrófilos tras la administración de vesnarinona durante 90 días o más se clasificaron como “sujetos con granulocitopenia” Cada uno de estos grupos se clasificó además en dos grupos de acuerdo con el sexo para pasar, de este modo, a cuatro subgrupos; es decir, un grupo de 13 varones con granulocitopenia (grupo A), un grupo de 17 mujeres con granulocitopenia (grupo B), un grupo de 33 varones sin granulocitopenia (grupo C) y un grupo de 21 mujeres sin granulocitopenia (grupo D).

(c) Gen y polimorfismo (SNP) que se va a analizar

115 genes candidatos se seleccionaron de entre, por ejemplo, genes relacionados con citocinas, genes de la región del MHC, genes relacionados con G-CSF, genes relacionados con TNF- $\alpha$ , genes relacionados con NF- $\kappa$ , genes relacionados con AMPc y genes relacionados con los canales de potasio. Los polimorfismos (SNP) de estos genes candidatos se buscaron en la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido japoneses (JSNP: <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/indexja.html>), y se seleccionaron 188 SNP candidatos.

(d) Procedimiento de análisis

Los SNP se analizaron mediante el ensayo Invader. El ensayo Invader se realizó con referencia a las publicaciones (1) y (2) siguientes:

(1) Lyamichev, V., y col., Nat. Biotechnol., 17: 292-296 (1999); y

(2) Publicación de patente internacional WO 9823774 (98/6/4).

Con el fin de amplificar las regiones de ADN genómico que incluyen cada uno de los SNP candidatos mediante PCR se diseñó un conjunto de cebadores para amplificar estas regiones en base a los datos de secuencia del ADN genómico alrededor de los SNP que se han buscado en la JSNP y se sintetizó cada uno de los cebadores.

Un reactivo de ensayo Invader para determinar los genotipos de los SNP candidatos se preparó mediante un procedimiento habitual en base a los datos de secuencia del ADN genómico alrededor de los SNP que se han buscado en la JSNP.

Cada PCR se realizó mediante el uso de ADN genómico (1 ng) como molde. Una mezcla de reacción (15  $\mu\text{l}$ ) contenía dNTP (0,25 mM), el tampón de PCR unido a TaKaRa Ex Taq (Takara) (1/10 de la cantidad total para reacción), un conjunto de un cebador directo y uno inverso (130 nM cada uno) y TaKaRa Ex Taq (Takara) (0,5 U). Cada muestra se amplificó en DNA Engine PTC-0200 (MJ Research) La PCR se realizó a 94 °C durante 2 minutos, después 50 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C (o 58 °C o 60 °C) durante 30 segundos y 72 °C durante 90 segundos.

La reacción del ensayo Invader se llevó a cabo mezclando el reactivo del ensayo Invader con el producto de la PCR que se diluyó con un intervalo de 10 a 1.000 veces. Una mezcla de reacción (15  $\mu\text{l}$ ) contenía 5,5 x tampón de Invader (2,75  $\mu\text{l}$ ), 10 x Bioplex FRET Probe Mix (0,75  $\mu\text{l}$ ), enzima Cleavase VIII (200 ng/  $\mu\text{l}$ ) (1  $\mu\text{l}$ ), PPI Mix (3  $\mu\text{l}$ ),

y el producto de la PCR diluido descrito anteriormente (7,5  $\mu\text{l}$ ). La reacción se realizó a 62 °C durante de 60 a 120 minutos.

(e) Procedimiento de determinación del genotipo

El genotipo de cada sujeto se determinó en base a las intensidades de dos materiales fluorescentes diferentes detectados como resultado de la reacción del ensayo Invader. Por tanto, los genotipos de los 188 SNP localizados en los 115 genes de cada sujeto se determinaron mediante el ensayo Invader.

(f) Procedimiento de análisis estadístico

Las frecuencias de los alelos en el grupo de sujetos con granulocitopenia se compararon con las de los sujetos sin granulocitopenia mediante la prueba de  $\chi^2$  cuadrado de contingencia.

El cociente de posibilidades se estimó mediante el método de Brown (Brown, C. C., Am. J. Epidemiol, 113: 474-480 (1981)). El intervalo de confianza del 95 % del cociente de posibilidades se calculó mediante el método de Woolf.

(g) Resultados

Los resultados del análisis de los 188 SNP en los 115 genes mediante el procedimiento mencionado anteriormente revelaron que el polimorfismo con la asociación más estadísticamente significativa se localizó en el gen del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) (JSNP 10: IMS-JST040476). En estos sujetos, este SNP estaba en el equilibrio de Hardy-Weinberg. El resultado sugiere que el SNP en el gen IRS-2 humano está estrechamente relacionado con la granulocitopenia atribuida a la administración de vesnarinona y que el gen IRS-2 humano es probable que desempeñe un papel importante en la patogenia de la granulocitopenia. La proteína del IRS-2 humano (producto de

la traducción del gen IRS-2 humano) pertenece a la familia de proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS: IRS-1, IRS-2, IRS-3, y IRS-4). Las IRS son activadas por la tirosina quinasa del receptor de insulina que fosforila residuos de tirosina de IRS. Como se sabe, las IRS-fosforiladas están relacionadas con la acción de la insulina que es estimular la captación de glucosa mediante aceleración de la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) desde el citoplasma a la membrana celular mediante PI-3 quinasa activada por las IRS fosforiladas. Con el fin de realizar estudios adicionales sobre la relación entre el gen de IRS-2 humana y la granulocitopenia inducida por vesnarinona se analizaron otros polimorfismos del gen IRS-2 humano.

Ejemplo 2 Análisis de asociación del gen IRS-2 humano y granulocitopenia inducida por fármacos

Mediante el uso de los sujetos descritos en el Ejemplo 1 se analizaron los polimorfismos del gen IRS-2 humano del siguiente modo.

(a) Descubrimiento de polimorfismos en el gen IRS-2 humano

Con el fin de seleccionar la totalidad del gen IRS-2 que incluye una región promotora implicada en su regulación transcripcional, la secuencia genómica que incluye el gen IRS-2 se obtuvo en GenBank (número de registro AL 162497, longitud completa: 143.409 pb) buscando la secuencia de ARNm de IRS-2, que está registrada en GenBank (número de registro XM\_007095). La estructura del gen IRS-2 humano se estimó mediante comparación detallada entre la secuencia de ARNm de IRS-2 y la secuencia genómica que incluye el gen IRS-2. Cabe destacar que se usó una hebra complementaria de la secuencia genómica obtenida anteriormente para la comparación, de modo que las secuencias comparadas anteriormente estaban en la misma dirección (de 5' a 3'). Del resultado se deduce que el gen IRS-2 humano tiene una longitud completa de 32.730 pb, incluidos dos exones y un intrón. En base a los datos de secuencia anteriores se diseñaron y sintetizaron los cebadores. Para el descubrimiento del polimorfismo se usaron muestras genómicas de 12 sujetos con granulocitopenia y 12 sujetos sin granulocitopenia entre los sujetos descritos en el Ejemplo 1.

Cada PCR se realizó mediante el uso de ADN genómico (5 ng). Se preparó una mezcla de reacción (10 µl) que contuviera dNTP (1,25 mM), cloruro de magnesio (3,9 mM), sulfato amónico amoniaco (16,6 mM), Tris-HCl (67 mM, pH 8,8), β-mercaptoetanol (10 mM), un conjunto de un cebador directo y un cebador inverso (1,25 mM), y TaKaRa Ex Taq (Takara) (0,5 U). Si se desea, se añadió a la reacción DMSO (dimetilsulfóxido) a la mezcla de reacción de modo que la concentración final fuera del 10%. Cada muestra se amplificó mediante el uso de DNA Engine PTC-0200 (MJ Research) o GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). La PCR se realizó a 95 °C durante 2 minutos, después 37 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C (o 58 °C o 60 °C) durante 30 segundos y 72 °C durante 3 minutos con extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

Cada producto de la PCR se empleó para reaccionar con BigDye™ Terminator RR mix (PE Applied Biosystems). En base a los datos de la secuencia de nucleótidos obtenida mediante ABI Prism 3700 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems), se detectaron los polimorfismos genéticos y sus posiciones en el gen IRS-2 humano se confirmaron mediante el uso de SEQUENCHER 3.1 (producto de Gene Codes).

(b) Procedimiento de determinación del genotipo y amplificación de la muestra

Con el fin de determinar la distribución del genotipo, todos los polimorfismos identificados mediante el descubrimiento anterior se analizaron en todos los sujetos descritos en el Ejemplo 1 amplificando las regiones que contienen los polimorfismos con los conjuntos de cebadores y secuenciando los productos de la PCR en las condiciones descritas anteriormente.

(c) Análisis estadístico

Además de los procedimientos estadísticos usados en el Ejemplo 1, se calculó un coeficiente de desequilibrio de unión pareada ( $D' = D/D_{\text{máx}} \text{ o } D/D_{\text{mín}}$ ) mediante el uso del método de Thompson, y col. (Thompson, E.A., y col., Am. J. Hum. Genet. 42: 113-124 (1988))

(d) Resultados

Los resultados del análisis revelaron que, en los grupos de los sujetos, todos los polimorfismos analizados en el presente Ejemplo están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los resultados del análisis también revelaron que seis polimorfismos estaban estrechamente asociados con la granulocitopenia inducida mediante la administración de vesnarinona. Las tablas 1 a 6 muestran los resultados del análisis estadístico en los seis polimorfismos respectivamente.

ES 2 391 076 T3

[Tabla 1]

Polimorfismo El número del genotipo	Sujetos con agranulocitosis N (%)	Sujetos sin agranulocitosis N (%)	$\chi^2$ (df= 1)	P	OR (IC del 95 %)
C-4587A					
CC	7 (25,0)	29 (59,2)	8,36	0,0038	4,35 (1,56-12,16)
CA+AA	21 (75,0)	20 (40,8)			
Total	28	49			

[Tabla 2]

Polimorfismo El número del genotipo	Sujetos con agranulocitosis N (%)	Sujetos sin agranulocitosis N (%)	$\chi^2$ (df= 1)	P	OR (IC del 95 %)
AT-2510del					
AT	7 (24,1)	28 (57,1)	8,02	0,0046	4,19 (1,51-11,64)
ATdel+del	22 (75,9)	21 (42,9)			
Total	29	49			

[Tabla 3]

Polimorfismo El número del genotipo	Sujetos con agranulocitosis N (%)	Sujetos sin agranulocitosis N (%)	$\chi^2$ (df= 1)	P	OR (IC del 95 %)
A-1164C					
AA	8 (26,7)	29 (59,2)	7,9	0,0049	3,99 (1,48 -10,73)
AC+CC	22 (73,3)	20 (40,8)			
Total	30	49			

[Tabla 4]

Polimorfismo El número del genotipo	Sujetos con agranulocitosis N (%)	Sujetos sin agranulocitosis N (%)	$\chi^2$ (df= 1)	P	OR (IC del 95 %)
A15870G					
AA	10 (37,0)	36 (73,5)	9,67	0,0019	4,71 (1,72 - 12,88)
AG+GG	17 (63,0)	13 (26,5)			
Total	27	49			



[Tabla 5]

Polimorfismo	Sujetos con agranulocitosis	Sujetos sin agranulocitosis	$\chi^2$ (df= 1)	P	OR (IC del 95 %)
El número del genotipo	N (%)	N (%)			
A29793G					
AA	11 (36,7)	39 (73,6)	10,9	0,00096	4,81
AG+GG	19 (63,3)	14 (26,4)			(1,84-12,56)
Total	30	53			

[Tabla 6]

Polimorfismo	Sujetos con agranulocitosis	Sujetos sin agranulocitosis	$\chi^2$ (df= 1)	P	OR (IC del 95 %)
El número del genotipo	N (%)	N (%)			
C31532del					
CC	9 (33,3)	34 (70,8)	9,93	0,0016	4,86
Cdel+del	18 (66,7)	14 (29,2)			(1,76 -13,39)
Total	27	48			

5 En las Tablas, un polimorfismo con el símbolo "del" corresponde a un polimorfismo de delección y el número de posición de cada "polimorfismo" corresponde al número de posición que cuenta desde A (número de posición: +1) de ATG (codón de inicio de la traducción) del gen IRS-2. Un polimorfismo mostrado por el número de posición con el símbolo "-" se localiza en 5' de A de ATG (codón de inicio de la traducción) del gen IRS-2.

10 Como se muestra en las Tablas 1 a 6, un sujeto que tenga al menos uno de estos seis polimorfismos ha mostrado la asociación con la granulocitopenia por administración de vesnarinona. En otras palabras, estos resultados sugieren que uno de estos polimorfismos, "C-4587A", que es un polimorfismo obtenido mediante la conversión de C en A en la posición 4.587 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 humano; "AT-2510del", que es un polimorfismo obtenido mediante la delección de AT en la posición 2510 en 5' del codón de inicio de la traducción de la región de codificación; "A-1164C", que es un polimorfismo obtenido mediante la conversión de A a C en la posición 1.164 en 5' del codón de inicio de la traducción de la región de codificación; "A15870G", que es un polimorfismo obtenido mediante la conversión de A en G en la posición 15.870 en 3' del codón de inicio de la traducción de la región de codificación; "A29793G", que es un polimorfismo obtenido mediante la conversión de A en G en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción de la región de codificación; y "C31532del", que es un polimorfismo obtenido mediante la delección de C en la posición 31.532 en 3' del codón de inicio de la traducción de la región de codificación, está asociado con granulocitopenia por la administración de vesnarinona. La Fig. 1 muestra las posiciones de estos seis polimorfismos en el gen IRS-2 humano. En la Fig. 1, "+1" corresponde a A de ATG (codón de inicio de la traducción). La Tabla 7 muestra los resultados del análisis del desequilibrio de unión entre estos polimorfismos.

[Tabla 7]

SNP	D'				
	C-4587A	AT-251 Ode 1	0' A-1164C	A15870G	A29793G
AT-251 Odel	1,000	-	-	-	-
A-1164C	1,000	1,000	-	-	-
A15870G	1,000	1,000	1,000	-	-
A29793G	0,956	0,956	0,957	1,000	-
C31532del	0,952	0,953	0,953	1,000	1,000

5 Como queda claro en la Tabla 7, todos los polimorfismos, que están estrechamente asociados con granulocitopenia por administración de vesnarinona, están en desequilibrio de unión casi completo. Específicamente, cuando el alelo en la posición 4587 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen IRS-2 es A (tipo mutante), cada uno de los polimorfismos en los otros cinco sitios polimórficos tiene el genotipo que muestra asociación con granulocitopenia por administración de vesnarinona. Los resultados sugieren fuertemente que estos seis polimorfismos del gen IRS-2 humano desempeñan un papel importante en la granulocitopenia por administración de vesnarinona.

10 Recientemente se ha notificado que cuando las células HL-60 (mieloblastos) se diferencian en granulocitos mediante estimulación con DMSO, la cantidad de proteína IRS-2 aumenta (Schacher, D. H., y col., J. Immunol., 164: 113-120 (2000)). Este informe sugiere que IRS-2 está estrechamente asociado con la diferenciación granulocítica. Entre los polimorfismos del gen IRS-2 analizados o identificados por los presentes inventores, tres polimorfismos (C-4587A, AT-251 Odel, and A-1164C) se localizan en la región promotora, que regula la transcripción del gen IRS-2 humano. Por tanto, puede indicarse que los niveles de transcripción del gen IRS-2 son reducidos por estos polimorfismos localizados en la región promotora, de modo que también se reduce la diferenciación en granulocitos.

15 Ejemplo 3

Este ejemplo está relacionado con otros procedimientos para detectar los seis polimorfismos del gen IRS-2 humano de la presente invención. En este ejemplo, estos polimorfismos se detectaron mediante los procedimientos descritos más adelante (a) y (b).

(a) Secuenciación directa

20 Los fragmentos de ADN se amplificaron mediante el uso de cebadores directos (SEC ID N° 1, 4, 7, 10, 13, y 15) y cebadores inversos (SEC ID N° 2, 5, 8, 11, 14 y 16) descritos en la Tabla 8, de modo que estos productos amplificados por PCR incluyeron los seis polimorfismos de acuerdo con la presente invención. Esta operación se realizó el uso de DNA Engine PTC-0200 (MJ Research) o GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). Cada PCR se realizó a 95 °C durante 2 minutos, después 37 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, la temperatura de hibridación mostrada en la Tabla 8 durante 30 segundos, la reacción de extensión a 72 °C durante el tiempo que se indica en la Tabla 8 con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Para cada uno de los fragmentos de ADN, como se describe en la Tabla 8, la temperatura de hibridación y el tiempo de reacción de la extensión son 58 °C a 60 °C y de 0,5 minutos a 3 minutos, respectivamente.

[Tabla 8]

	Cebador directo	Número de posición del nucleótido en AL162497	Cebador inverso	Número de posición del nucleótido en AL162497	Temperatura de hibridación (°C)	Tiempo de extensión (min)	DMSO
C-4587A	SEC ID N° 1	131420-131399	SEC ID N° 2	130318-130339	60	3	-
AT-2510del	SEC ID N°4	128930-128911	SEC ID N°5	127491-127510	60	3	-
A-1164C	SEC ID N° 7	127837-127818	SEC ID N° 8	126460-126479	60	3	+
A15870G	SEC ID N° 10	110260-11 0240	SEC ID N° 11	109859-109879	60	3	-
A29793G	SEC ID N° 13	96209-96190	SEC ID N° 14	96070-96091	58	0,5	-
C31532de	SEC ID N° 15	94616-94595	SEC ID N° 16	93139-93159	60	3	-

30 El componente de una mezcla de reacción es como se describe en el Ejemplo 2-(a). Cabe destacar que se añadió DMSO a la mezcla de reacción para detectar "A-1164C" de modo que la concentración final fuera del 10 % (véase la

columna "DMSO" de la Tabla 8). G en la posición 23 del cebador inverso (SEC ID N° 14) empleado para la detección de "A29793G" descrito en la Tabla 8 fue una base sustituida para crear un sitio polimórfico que es reconocido por la enzima de restricción *Afa* I.

5 Los polimorfismos distintos a "A29793G" se detectaron mediante secuenciación directa (método didesoxi (Sanger, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463-5467 (1977) o el método de Maxam-Gilbert (Methods in Enzymology, 65, 499 (1980). La Tabla 9 muestra cebadores para determinar el genotipo de cada polimorfismo (SEC ID N° 3, 6, 9, 12 y 17).

[Tabla 9]

10

	<b>Cebador para secuenciación</b>	<b>Número de posición del nucleótido en AL162497</b>
C-4587A	SEC ID N°3	130343-130363
AT-2510del	SEC ID N°6	128581-128562
A-1164C	SEC ID N°9	126912-126929
15 A15870G	SEC ID N°12	110249-110231
C31532del	SEC ID N°17	94556-94537

15

20 El análisis PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento con enzimas de restricción) se realizó para detectar "A29793G". Específicamente, una mezcla de reacción ((20 µl) contenía el producto de PCR (10 µl ), 2 unidades de la enzima de restricción *Afa* I (10 unidades/ml, Takara), y 10 x de tampón T unido a la enzima de restricción (2 µl ). A la mezcla de reacción se añadió BSA de modo que la concentración final fuera 0,01 % y la mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 16 horas. Los fragmentos de ADN digeridos se separaron mediante el uso de gel de agarosa al 4% y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio y transiluminación ultravioleta.

20

25 Cuando el ADN extraído de una muestra de un sujeto se aplica a cualquiera de los procedimientos de detección para los seis polimorfismos del gen IRS-2 humano, descrito antes en los Ejemplos antes de la administración de un fármaco que puede inducir granulocitopenia, se puede determinar la posibilidad de una granulocitopenia inducida por fármacos (incluida agranulocitosis), es decir el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, el riesgo de granulocitopenia atribuida a la administración de vesnarinona se puede examinar o evaluar mediante el análisis del ADN de un sujeto.

25

30

La presente invención es útil para examinar o evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano, particularmente útiles para examinar o evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos en un ser humano antes de la administración de un fármaco que ya se ha notificado que induce granulocitopenia (incluida agranulocitosis).

35

El contenido de la solicitud de patente europea nº 04 770 985.2 (caso padre), incluidos al descripción completa, todas las reivindicaciones y las figuras, se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Otsuk Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Un procedimiento para determinar el riesgo de agranulocitosis inducida por fármacos

40

<130> OP0046

<140>

<141>

<160>17

<170> PatentIn ver. 2.1

45

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 1

accactgtat ttgtgacaactc 22

10 <210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 2

aaatatggat cagtctctttcc 22

<210> 3

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 3

atgttcattt tatgagggag g 21

<210> 4

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

35 <400> 4

aactgccaat ccagagctgc 20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

5 <400> 5

tctcaccaca cgcgttcaag 20

<210> 6

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

15 <400> 6

ccacamt cttcaagcacc 20

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 7

25 gagcttgctg ggatctgaac 20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 8

atgtgactcg gcgttacgca 20

35 <210> 9

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

## ES 2 391 076 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 9

5 ccttgcatg gaagcatg 18

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 10

ctatcccgat tctagatgtc 21

15 <210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 11

gactcatctg tgactaactcc 21

<210> 12

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

<400> 12

cctagatgtc agcttgccc 19

<210> 13

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)

# ES 2 391 076 T3

- <400> 13  
tctggaactc cagagattgc 20
- <210> 14  
<211> 25
- 5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)
- 10 <400> 14  
tgctgagcgt ctcttttaatgta 25
- <210> 15  
<211> 22  
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)
- <400> 15
- 20 gaggctttt tagaggaagacc 22
- <210> 16  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)
- <400> 16  
catgcatgg agggagcattc 21
- 30 <210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del cebador para amplificación de los SNP de la sustancia 2 del receptor de insulina (IRS-2)
- <400> 17  
gcaaaagtct tctgcttcc 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un kit para detectar un polimorfismo del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana empleado para determinar la presencia del riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos, en el que el kit comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de 10 a 35 bases como se define a continuación en (a) a (f) como cebadores o sondas para detectar polimorfismos del gen del sustrato 2 del receptor de insulina:
- 5 (a) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de C en A en la posición 4.587 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- 10 (b) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es deleción de AT en la posición 2.510 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- (c) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en C en la posición 1.164 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- 15 (d) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en C en la posición 15.870 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- (e) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en C en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana; y
- 20 (f) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es deleción de C en la posición 31.532 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana.
- en el que los números de posición corresponden a los números de posición contando desde A de ATG como codón para Met al extremo N de la proteína cuando se traduce el ARNm en la proteína.
- 25
2. Un kit para evaluar el riesgo de granulocitopenia inducida por fármacos, en el que el kit comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de 10 a 35 bases como se define más adelante en (a) a (f) que sirve como cebador o sonda para detectar un polimorfismo del gen del sustrato 2 del receptor de la insulina:
- 30 (a) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de C en A en la posición 4.587 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- (b) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es deleción de AT en la posición 2.510 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- 35 (c) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en C en la posición 1.164 en 5' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- (d) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en C en la posición 15.870 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana;
- 40 (e) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es la conversión de A en C en la posición 29.793 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana; y
- 45 (f) un oligonucleótido que tiene una secuencia que incluye un polimorfismo genético que es deleción de C en la posición 31.532 en 3' del codón de inicio de la traducción del gen del sustrato 2 del receptor de insulina humana.
- en el que los números de posición corresponden a los números de posición contando desde A de ATG como codón para Met al extremo N de la proteína cuando se traduce el ARNm en la proteína.
- 50 3. El kit de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que además comprende un oligonucleótido que puede hibridar con el gen del sustrato 2 del receptor de la insulina humana y que se usa como sonda para la detección de polimorfismos



genéticos, seleccionándose dicho oligonucleótido del grupo constituido por los oligonucleótidos descritos en (a) a (d) y (f):

(a) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 3;

(b) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 6;

5 (c) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 9;

(d) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 12; y

(f) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 17;

10 4. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende oligonucleótidos que pueden hibridar con el gen del sustrato 2 del receptor de la insulina humana y que se usan como cebadores para la detección de polimorfismos genéticos, seleccionándose dichos oligonucleótidos del grupo constituido por combinaciones de los oligonucleótidos descritos más adelante en (a) y (b), (c) y (d), (e) y (f), (g) y (h), (i) y (j), y (k) y (l):

(a) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1;

(b) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 2;

15 (c) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 4;

(d) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 5;

(e) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 7;

(f) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 8;

(g) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 10;

20 (h) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 11;

(i) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 13;

(j) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 14;

(k) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 15; y

(l) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 16

25 5. El kit de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en que dicho kit comprende oligonucleótidos como se describe en (e) de la reivindicación 1 o 2 y la enzima de restricción Afa I, usándose el kit para detectar la conversión de A en G en la posición 29.793 en 3' desde el codón de inicio de la traducción del sustrato 2 del receptor de la insulina humana.

[Fig. 1]

