

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0609702-2 A2**



(22) Data de Depósito: 20/03/2006  
(43) Data da Publicação: 20/04/2010  
(RPI 2050)

(51) *Int.Cl.:*  
C12Q 1/68 (2010.01)  
A61K 9/20 (2010.01)

(54) Título: **BIOMARCADORES PARA A EFICÁCIA DE ALISKIREN COMO UM AGENTE HIPERTENSIVO**

(30) Prioridade Unionista: 22/03/2005 US 60/664,248,  
06/02/2006 US 60/742,401, 06/02/2006 US 60/742,401

(73) Titular(es): NOVARTIS AG

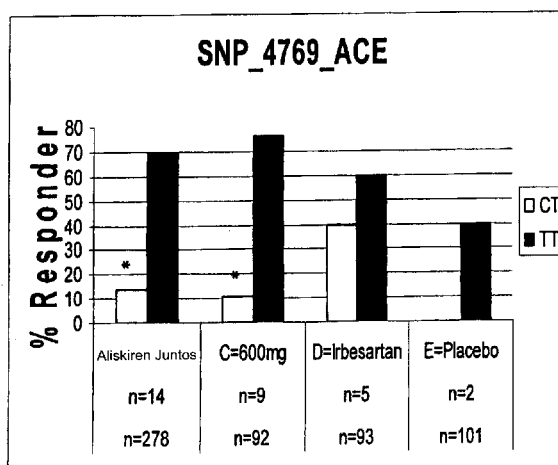
(72) Inventor(es): JESSIE GU, JOANNE MEYER

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &  
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006009913 de 20/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/102177 de 28/09/2006

(57) Resumo: BIOMARCADORES PARA A EFICÁCIA DE ALISKIREN COMO UM AGENTE HIPERTENSIVO. A presente invenção refere-se a uma análise farmacogenética retrospectiva que foi conduzida em uma tentativa de avaliar a associação potencial entre uma variação genética e o resultado de um estudo clínico de eficácia de aliskiren como um agente anti-hipertensivo. Quarenta e cinco polimorfismos foram examinados em doze genes do sistema de reninaangiotensina-aldosterona (RAS) ou previamente implicados na regulação da pressão arterial. Associações significativas foram vistas entre um polimorfismo no gene da enzima de conversão de angiotensina (ACE), dois polimorfismos no gene do receptor de angiotensina II do tipo 2 (AGTR2), e parâmetros clínicos da redução de pressão arterial sistólica e diastólica média em repouso. Estes efeitos não foram encontrados com tratamento com irbesartan e placebo, mas ao invés disso foram específicos ao tratamento com aliskiren.





PI0609702-2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**BIOMARCADORES PARA A EFICÁCIA DE ALISKIREN COMO UM AGENTE HIPERTENSIVO**".

Campo da Invenção

- 5                   A presente invenção refere-se geralmente ao teste analítico com amostras de tecido *in vitro*, e mais particularmente aos aspectos de polimorfismos genéticos indicativos da eficácia de aliskiren como um agente anti-hipertensivo.

Antecedentes da Invenção

- 10                   O sistema de angiotensina de renina (RAS) desempenha um papel importante na regulação da pressão sangüínea e no volume da homeostase. A renina é secretada pelos rins em resposta à diminuição no volume da circulação e da pressão arterial, e divide o substrato angiotensinógeno para formar a angiotensina de decapeptídeo inativo I (Ang I). A Ang I é
- 15                   convertida para Ang II de octapeptídeo de enzima de conversão ativa (ACE). A Ang II interage com receptores celulares induzindo a vasoconstrição e liberação de catecolaminas da medula adrenal e extremidades do nervo pré-juncionais. Ela promove a secreção de aldosterona e reabsorção de sódio. Além disso, a Ang II inibe a liberação da renina, dessa maneira provê um
- 20                   *feedback* negativo para o sistema. Por conseguinte, a Ang II atua em vários níveis (*por exemplo* vasculatura, sistema nervoso simpático, cortex e medula da glândula adrenal) para aumentar a resistência vascular e a pressão arterial.

- O sistema de angiotensina de renina (RAS) pode ser bloqueado
- 25                   em vários níveis. Uma vez que os inibidores de renina bloqueiam o RAS em um nível mais alto que os inibidores do ACE e os antagonistas de Ang II, eles têm um efeito diferente sobre os componentes de RAS. Após a administração de um inibidor de renina, a formação de ambas, Ang I e Ang II, é bloqueada. Enquanto que, depois da inibição da ACE, somente a formação de
- 30                   Ang II é bloqueada e os níveis de Ang I aumentam. A Ang I está assim disponível para ser convertida para Ang II e outros peptídeos de angiotensina por outras vias tais como o sistema de quimases.

- O aliskiren (SPP100) é um agente anti-hipertensivo não-peptídeo com um peso molecular baixo (609,8). Vide, Wood JM *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308(4):698-705 (5 de setembro de 2003). O mecanismo de ação é diferente do de outros anti-hipertensivos do mercado.
- 5 O aliskiren bloqueia o sistema de angiotensina de renina (RAS) em sua etapa primeira e de variação limitante. *In vitro*, o aliskiren é um inibidor potente de renina humana ( $IC_{50} = 0,6$  nM). *In vivo*, o aliskiren administrado oralmente (p.o.) ou intravenosamente (i.v.), em diversos estudos com sagüis depletados por sódio, causou completa inibição da atividade de renina do plasma
- 10 (PRA), sustentando reduções na pressão arterial média (MAP), e aumentos significativos em concentrações de plasma de renina total e ativa. Em seres humanos, as concentrações de plasma de aliskiren aumentam rapidamente depois da administração, alcançando picos dos níveis em 3 a 5 horas. Ambas,  $C_{max}$  e AUC, aumentam com a dose, mas não de uma maneira linear. A
- 15 média de vida do aliskiren é aproximadamente 25 horas e sua biodisponibilidade é aproximadamente 2,7%.

Abordagens médicas convencionais para diagnóstico e tratamento da doença são baseadas em dados clínicos somente, ou feitas em conjunto com um teste de diagnóstico. Tais práticas tradicionais muitas vezes

20 levam às escolhas terapêuticas que não são ideais para a eficácia da terapia do fármaco prescrito ou para minimizar a probabilidade de efeitos colaterais para um sujeito indivíduo. Diagnósticos específicos de terapia (*a.k.a.*, teranósticos) em um campo de tecnologia média emergente, que provê testes úteis para diagnosticar uma doença, escolhem o regime de

25 tratamento correto e monitoram a resposta de um sujeito. Isto é, os teranósticos são úteis para prever e acessar respostas de fármacos em sujeitos individuais, isto é, medicina individualizada. Os testes de teranóstico são também úteis para selecionar sujeitos para tratamentos que são particularmente prováveis de se beneficiarem do tratamento, ou para prover uma

30 indicação precoce e objetiva da eficácia do tratamento em sujeitos individuais, de modo que o tratamento pode ser alterado com um mínimo de demora.

O progresso em farmacogenética, que estabelece correlações

entre as respostas a fármacos específicos e o perfil genético de pacientes individuais, é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens teranósticas. Como tal, há uma necessidade na técnica para a avaliação de variações paciente para paciente em seqüência de genes e expressão de genes. Uma forma comum de traçar um perfil genético conta com a identificação das variações da seqüência do DNA chamadas polimorfismos de nucleotídeo simples ("SNPs"), que são um tipo de mutação genética que conduz à variação de paciente para paciente na resposta do indivíduo ao fármaco. Segue-se que há uma necessidade na técnica para identificar e caracterizar mutações genéticas, tais como os SNPs, que são úteis para identificar os genótipos de sujeitos associados com a receptividade do fármaco.

#### Sumário da Invenção

A presente invenção provê uma resposta para a necessidade na técnica. Associações significativas são identificadas entre polimorfismos no gene da enzima de conversão de angiotensina (ACE), polimorfismos no gene do receptor da angiotensina II do tipo 2 (AGTR2), e parâmetros clínicos de diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica média em repouso em seguida ao tratamento com aliskiren como um agente anti-hipertensivo. Esses efeitos não são encontrados no tratamento com irbesartan e com placebo, mas ao contrário são específicos do tratamento com aliskiren.

Dessa maneira, a invenção provê o uso de aliskiren na fabricação de um medicamento para o tratamento de hipertensão em uma população de pacientes selecionada. A população de pacientes a ser tratada é selecionada com base nos polimorfismos genéticos em genes de biomarcador presentes nos pacientes. Os genes de biomarcador são o gene da enzima de conversão de angiotensina (ACE) e o gene de receptor de angiotensina II do tipo 2 (AGTR2). Os polimorfismos genéticos são indicativos da eficácia do aliskiren para tratar a hipertensão.

A invenção também provê um método de diagnóstico para determinar a receptividade de um indivíduo com hipertensão ao tratamento com aliskiren, com base na identidade de um par de nucleotídeos em um ou mais locais genéticos polimórficos da invenção.

A invenção ainda provê um método teranóstico para tratar a hipertensão em um indivíduo. Um agente anti-hipertensivo é administrado para o indivíduo, se o par de nucleotídeos nos locais genéticos polimórficos da invenção indicam que o indivíduo é sensível ao tratamento com um agente anti-hipertensivo. Em uma modalidade o agente anti-hipertensivo é aliskiren. Uma terapia alternativa é administrada para o indivíduo, se o par de nucleotídeos, nos locais genéticos polimórficos da invenção, indicam que o indivíduo não é sensível ao tratamento com um agente anti-hipertensivo.

A invenção geralmente provê um método de redução da pressão arterial diastólica em ambulatorio durante o dia (DADBP). Em uma modalidade específica, a invenção provê um método teranóstico de redução da pressão arterial diastólica média em repouso (MSDBP).

Adicionalmente, a invenção provê um método de redução da pressão arterial sistólica em ambulatorio durante do dia (DASBP). Em uma modalidade específica, a invenção provê um método teranóstico de redução da pressão arterial sistólica média em repouso (MSSBP).

Além disso, a invenção provê um método para a escolha de indivíduos para inclusão em um teste clínico a fim de determinar a eficácia de um agente anti-hipertensivo para o tratamento da hipertensão. Um indivíduo pode ser incluído no teste se o genótipo de indivíduo é indicativo de eficácia do agente anti-hipertensivo para tratar a hipertensão naquele indivíduo. O indivíduo pode ser retirado da inclusão no teste se genótipo do indivíduo não é indicativo de eficácia do agente anti-hipertensivo para tratar a hipertensão naquele indivíduo.

A invenção provê kits para a prática dos métodos da invenção. A invenção também provê uma maneira de usar o produto do gene da enzima de conversão da angiotensina (ACE) e o produto do gene de receptor da angiotensina II do tipo 2 (AGTR2) como alvos para descoberta de fármacos.

#### Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é um conjunto de gráficos de barra mostrando a relação de responder segregada pelo genótipos de SNP\_4769 para os três grupos tratados com aliskiren juntos, o grupo de dose mais alta de aliskiren (600

mg), o grupo de irbesartan e o grupo de placebo. Nas filas da parte inferior da figura, a fila que fica em cima se refere ao alelo de CT e as de baixo se referem ao alelo de TT.

#### Descrição Detalhada da Invenção

5                    Uma análise farmacogenética retrospectiva foi conduzida em uma tentativa de avaliar a associação potencial entre a variação genética e o resultado clínico em um teste clínico. No teste clínico, o aliskiren com 75, 150, ou 300 mg administrado uma vez por dia mostrou ser um agente anti-hipertensivo eficaz em pacientes com hipertensão benígna a moderada, re-  
10                    sultando na redução estatisticamente significativa da pressão arterial sistólica de ambulatorio durante o dia (DASBP). Todas as doses de tratamento ativo foram estatisticamente superiores ao placebo na redução da pressão arterial diastólica média em repouso (MSDBP) no ponto final do teste clínico na população que se pretende tratar (ITT), na 8ª semana, e na população  
15                    por protocolo, no ponto final do teste clínico. Reduções de MSDBP similares foram conseguidas com aliskiren 150 mg e irbesartan 150 mg. Vide o exemplo I abaixo.

                    Para a pressão arterial sistólica média em repouso (MSSBP), todas as doses de tratamento ativo foram estatisticamente superiores ao  
20                    placebo no fim do teste clínico. O Aliskiren de 300 e 600 mg foi estatisticamente superior ao placebo e ao irbesartan no ponto final do teste clínico. Reduções de MSSBP similares foram alcançadas com aliskiren de 150 mg e irbesartan de 150 mg. O aliskiren de 300 e 600 mg produziu reduções maiores. Vide o exemplo I abaixo.

25                    Na análise farmacogenética, quarenta e oito polimorfismos foram examinados em doze genes do sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAS) ou previamente implicados na regulação da pressão arterial. Associações significativas foram vistas entre um polimorfismo no gene da enzima de conversão da angiotensina (ACE) (SNP\_4769, SEQ ID NO:1), dois poli-  
30                    morfismos no gene de receptor da angiotensina II do tipo 2 (AGTR2) (SNP\_1445, SEQ ID NO:2 e SNP\_4795, SEQ ID NO:3), e parâmetros clínicos da média de diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica. Esses

efeitos não foram encontrados no tratamento com irbesartan e placebo, ao contrário, eles foram específicos para o tratamento com aliskiren nessas análises.

5 A sequência de nucleotídeos de SNP\_4769 (SEQ ID NO:1) é como a seguir:

AGGACTTCCC AGCCTCCTCT TCCTGCTGCT CTGCTACGGG CACCCTCTGC  
TGGTCCCCAG CCAGGAGGCA/Y CCCAACAGGT GACAGTCACC CATGGGACAA  
GCAGCCAGGC AACACCAGC AGCCAGACAA CCACCCACCA

10 O SNP\_4769 é um SNP codificado que muda a sequência de aminoácido de prolina para serina no códon 32 na enzima de ACE.

A sequência de nucleotídeos de SNP\_1445 (SEQ ID NO:2) é como a seguir:

15 TGGAACTTC ATTTTTTTTG TTTGAGATTT ATTTGAATGA GCTGTTATGA  
TTGGAGACAG TGAGAATTTC AGATTAATGT TTTGCAGACA AAAAAAACC  
TCTCTGGAAA GCTGGCAAGG GTTCATAAGT CAGCCCTAGA ATTATGTAGG  
TTGAAGGCTC CCAGTGGACA GACCAAACAT ATAAGAAGGA AACCAGAGAT  
CTGGTGCTAT TACGTCCCAG CGTCTGAGAG AACGAGTAAG CACAGAATTC  
AAAGCATTCT GCAGCCTGAA TTTTGAAGGT AAGTATGAAC AATTTATATA  
TAATTTACTT GGAAAGTAGA ACATACATTA AATGAAAATA TTTTTTATGG  
20 ATGAACTTCT GTTTTTCCTG TGTTTAAACA CTGTATTTTG CAAAACTCCT/R  
AATTATTTAG CTGCTGTTTC TCTTACAGGA GTGTGTTTAG GCACTAAGCA  
AGCTGATTTA TGATAACTGC TTAAACTTC AACACCAGT AAGTCTTCAA  
GTGGAATTTA TTATTGATTC TTTTATGTTA ATTTGTTAGG TCAAAAGAAA  
AATCTTTAGA GCAAAATAAA AGTTTGTCTC TTTATTAGGA GGTTCTTTAG  
25 ATATTACACT TTTAATTGGG TAGCTTATTT GCATGTATTT TGAAACTATC  
TAAAGTAAAT AGTGTTTCCT TTGTATGCTT ATCTTTAGCT AATGTGTTTT  
TTTTTTTGGT TTAAAATAA TGCTTCTAGT GAAAAAATC AAAAAACCT  
CAACACTGTA ACGTTTGAGA GCAACGGCTA TTCAGTTCGG TTAAACCGAA

30 O SNP\_1445 é um região não traduzida de AGTR2 mRNA (vide a tabela 2B).

A sequência de nucleotídeos de SNP\_4795 (SEQ ID NO:3) é como a seguir:

ccaacacaaa agcacagcag ttgagaactg ggaaagcatc gcactacaac  
 tgctactgcc attaaccaca ttgtcctgga tgcccaagag cttaagagcc  
 cacttaccta cctggtacac tgctactaca actgacatct gagaaagcca  
 cccaaaggaa caagaatttc cctgtctgga accaacagaa ttgtcactat/R  
 5 ttctgtacca gatcccaagg atacacatgc ttagcttact attactacca  
 ctgaaacttg caaaagaacc catcaagcat tccattcccc agcacaaatt  
 catcagtttc tatcaataac ctcaaatgc cacacagagg aatagacaga  
 tactactaag gctgtttata gccaatgaaa tcatacacag tcttcacca

O SNP\_4795 está na região genômica de AGTR2 (vide a tabela  
 10 2B).

É para ser apreciado que certos aspectos, modos, modalidades,  
 variações e características da invenção estão descritos abaixo em vários  
 níveis de detalhes a fim de prover uma compreensão substancial da inven-  
 ção. Em geral, tal descrição provê novos usos de variações de polinucleotí-  
 15 deos, SNPs, úteis no diagnóstico e tratamento de sujeitos com necessidade  
 dos mesmos. Dessa maneira, os vários aspectos da presente invenção rela-  
 cionam a codificação de polinucleotídeos às variações de polinucleotídeos  
 da invenção nos genes de ACE e AGTR2. Os vários aspectos da presente  
 invenção ainda relacionam os métodos de diagnóstico / teranóstico e kits,  
 20 que usam as variações de polinucleotídeos da invenção, para identificar in-  
 divíduos predispostos à doença ou para classificar indivíduos em relação à  
 sensibilidade ao fármaco, efeitos colaterais, ou dose ideal de fármaco. Em  
 outros aspectos, a invenção provê métodos para a validação do composto e  
 um sistema de computador para armazenar e analisar os dados relaciona-  
 25 dos às variações de polinucleotídeos da invenção. Dessa maneira, a seguir  
 se encontram várias modalidades em particular que ilustram esses aspectos.

*Definições.* As definições de certos termos, como usado nesta  
 especificação, são fornecidas abaixo. Definições de outros termos podem  
 ser encontradas no glossário fornecido pelo Departamento de Energia, A-  
 30 gência de Ciências e Projeto de Genoma Humano dos Estados Unidos da  
 América:

<[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/glossary/](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/glossary/)>. Uma defi-



nição médica é fornecida por Chobanian *et al.*, "JNC-7 – Complete Version" *Hipertensão* 42: 1206-1252 (2003). A definição da American Heart Association de hipertensão pode ser encontrada no website <<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4623>>. Todas es-

5 sas referências estão aqui incorporadas por referência.

Como usado aqui, o termo "alelo" significa uma forma em particular de uma sequência de DNA ou gene em um locus cromossomal específico.

10 Como usado aqui, o termo "anticorpo" inclui, mas não é limitado a anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados ou quiméricos e fragmentos de anticorpos biologicamente funcionais para ligação de fragmento de anticorpo à proteína.

Como usado aqui, o termo "resposta clínica" significa qualquer uma ou todas as seguintes: uma medida quantitativa da resposta, nenhuma  
15 resposta, e resposta adversa (*isto é*, efeitos colaterais).

Como usado aqui, o termo "teste clínico" significa qualquer estudo de pesquisa projetado para coletar dados clínicos sobre respostas a um tratamento em particular, e inclui mas não está limitado à fase I, fase II e fase III dos testes clínicos. Métodos padrão são usados para definir a população de pacientes e para inscrever sujeitos.  
20

Como usado aqui, o termo "quantidade eficaz" de um composto é uma quantidade suficiente para conseguir o efeito terapêutico e / ou profilático desejado, por exemplo, uma quantidade que resulta na prevenção ou diminuição nos sintomas associados à hipertensão. Em uma modalidade  
25 preferida, o composto é aliskiren.

A quantidade de composto administrada para o sujeito vai depender do tipo e gravidade da doença e das características do indivíduo, tais como saúde em geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância aos fármacos. Vai também depender do grau, gravidade e tipo de doença. Um especialista  
30 versado será capaz de determinar as dosagens apropriadas dependendo desses e de outros fatores. Tipicamente, uma quantidade eficaz dos compostos da presente invenção, suficiente para conseguir um efeito terapêutico

ou profilático, varia de cerca de 0,000001 mg por kilograma de peso corporal por dia a cerca de 10,000 mg por kilograma de peso corporal por dia. Preferivelmente, as variações de dosagem são de cerca de 0,0001 mg por kilograma de peso corporal por dia a cerca de 100 mg por kilograma de peso corporal por dia. Os compostos da presente invenção podem também ser administrados em combinação um com o outro, ou com um ou mais compostos terapêuticos adicionais. Em uma modalidade preferida, a quantidade eficaz é aliskiren a 75, 150, ou 300 mg administrado uma vez diariamente.

Como usado aqui, "expressão" inclui mas não está limitado a um ou mais dos seguintes: transcrição do gene no mRNA precursor; junção ou outro processamento do mRNA precursor para produzir mRNA maduro; estabilidade de mRNA; tradução de mRNA maduro em proteína (incluindo uso de códon e disponibilidade de tRNA); e glicosilação e / ou outras modificações do produto de tradução, se exigido para expressão e função apropriadas.

Como usado aqui, o termo "gene" significa um segmento do DNA que contém todas as informações para a biossíntese regulada de um produto de RNA, incluindo promotores, exons, introns, e ou regiões não traduzidas que controlam a expressão.

Como usado aqui, o termo "genótipo" uma seqüência de 5' a 3' pares de nucleotídeos encontrados em um ou mais locais polimórficos em um local sobre um par de cromossomas homólogos em um indivíduo. Como usado aqui, genótipo inclui um genótipo todo e / ou um subgenótipo.

Como usado aqui, o termo "locus" significa um local sobre um cromossoma ou molécula de DNA correspondente a um gene ou uma característica física ou fenotípica.

Como usado aqui, o termo "agente de modulação de ACE" ou "agente de modulação de AGTR2" é qualquer composto que altera (*por exemplo*, aumenta ou diminui) o nível de expressão ou nível de atividade biológica do polipeptídeo de ACE ou polipeptídeo de AGTR2, respectivamente, em comparação ao nível de expressão ou nível de atividade biológica de polipeptídeos na ausência do agente de modulação. O agente de modulação

pode ser uma molécula pequena, um polipeptídeo, carboidrato, lipídeo, nucleotídeo, ou combinação dos mesmos. O agente de modulação pode ser um composto orgânico ou um composto inorgânico.

5 Como usado aqui, o termo "mutante" significa qualquer variação herdável tipo selvagem que é o resultado de uma mutação, *por exemplo*, polimorfismo de nucleotídeo único. O termo "mutante" é usado intercambiavelmente com os termos "marcador", "biomarcador", e "alvo" no decorrer de toda a especificação.

10 Como usado aqui, o termo "condição médica" inclui, mas não está limitado a, qualquer condição ou doença manifestada como um ou mais sintomas físicos e / ou psicológicos para os quais o tratamento é desejável, e inclui doenças previamente ou recentemente identificadas e outros distúrbios. Em uma modalidade preferida, a condição médica é hipertensão.

15 Como usado aqui, o termo "par de nucleotídeos" significa os nucleotídeos encontrados em um local polimórfico nas duas cópias de um cromossoma de um indivíduo.

20 Como usado aqui, o termo "local polimórfico" significa uma posição dentro de um locus em que pelo menos duas seqüências alternativas são encontradas em uma população, a mais freqüente das quais tem uma freqüência de não mais do que 99%.

25 Como usado aqui, o termo "polimorfismo" significa qualquer variante de seqüência presente a uma freqüência de >1% em uma população. A variante de seqüência pode estar presente a uma freqüência significativamente maior do que 1% tal como 5% ou 10 % ou mais. Além disso, o termo pode ser usado para se referir à variação de seqüência observada em um indivíduo em um local polimórfico. Polimorfismos incluem substituições, inserções, deleções e microssatélites de nucleotídeos e podem, mas não necessitam, resultar em diferenças detectáveis em expressão de gene ou função de proteína.

30 Como usado aqui, o termo "polinucleotídeo" significa qualquer RNA ou DNA, que pode ser RNA ou DNA modificado ou não modificado. Polinucleotídeos incluem, sem limitação, DNA de simples- e duplo-

filamentado, DNA que é uma mistura de regiões simples- e duplo- filamentada, RNA de simples- e duplo-filamentado, RNA que é uma mistura de regiões simples- e duplo- filamentadas, e moléculas híbridas que compreendem DNA e RNA que podem ser de filamento único ou, mais tipicamente, de filamento duplo ou uma mistura de regiões de filamento simples e duplo. Em adição, polinucleotídeo refere-se às regiões triplo-filamentadas compreendendo RNA ou DNA ou ambos, RNA e DNA. O termo polinucleotídeo também inclui DNAs ou RNAs que contêm um ou mais bases modificadas, e DNAs ou RNAs com as estruturas principais modificadas por estabilidade ou por outras razões.

Como usado aqui, o termo "polipeptídeo" significa qualquer polipeptídeo compreendendo dois ou mais aminoácidos ligados um ao outro por ligações de peptídeos ou modificados por ligações de peptídeos, isto é, peptídeo isósteres. Polipeptídeo refere-se às cadeias curtas, comumente referidas como peptídeos, glicopeptídeos ou oligômeros, e às cadeias mais longas, geralmente referidas como proteínas. Os polipeptídeos podem conter aminoácidos além de 20 aminoácidos de gene codificado. Os polipeptídeos incluem seqüências de aminoácidos modificados por processos naturais, tal como o processamento pós-translacional, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica. Tais modificações são bem descritas em textos básicos e em monografias mais detalhadas, como também em uma volumosa literatura de pesquisa.

Como usado aqui, o termo "ácido nucléico de SNP" significa uma seqüência de ácido nucléico, que compreende um nucleotídeo que é variável dentro uma seqüência de nucleotídeos de outra maneira idêntica entre indivíduos ou grupos de indivíduos, dessa maneira existindo como alelos. Tais ácido nucléicos de SNP têm preferivelmente cerca de 15 a cerca de 500 nucleotídeos de comprimento. Os ácidos nucleicos de SNP podem ser parte de um cromossoma, ou eles podem ser uma cópia exata de uma parte de um cromossoma, *por exemplo*, pela amplificação de tal parte de um cromossoma através da PCR ou através de clonagem. Os ácidos nucléicos de SNP são referidos doravante simplesmente como "SNPs". Um SNP é a ocor-

rência de variabilidade de nucleotídeo em uma posição única no genoma, no qual duas bases alternativas ocorrem com apreciável frequência (*isto é*, >1%) na população humana. Um SNP pode ocorrer dentro de um gene ou dentro de regiões intergênicas do genoma. As sondas de SNP, de acordo com a invenção, são oligonucleotídeos que complementares para um ácido nucléico de SNP.

Como usado aqui, o termo "sujeito" significa, preferivelmente, que o sujeito é um mamífero, tal como um ser humano, mas pode também ser um animal, *por exemplo*, animais domésticos (*por exemplo*, cachorros, gatos e os similares), animais da fazenda (*por exemplo*, vacas, carneiros, porcos, cavalos e os similares) e animais de laboratório (*por exemplo*, macaco (*por exemplo*, macacos cimólogos, ratos, camundongos, porquinhos da Índia e os similares).

Como usado aqui, a administração de um agente ou fármaco para um sujeito ou paciente inclui auto-administração e a administração por outros. Deve também ser apreciado que os vários modos de tratamento ou prevenção de condições médicas como descrito pretendem significar "substancial", que inclui total mas também menos do que tratamento ou prevenção total, e que em alguns resultados biologicamente ou medicamente relevantes são conseguidos.

*Identificação e Caracterização de Variação de Sequência de Gene.* Devido a sua natureza prevalescente e muito difundida, os SNPs têm o potencial para serem ferramentas importantes para localizar genes que estão envolvidos em condições de doença humana. Vide *por exemplo*, Wang *et al.*, *Science* 280: 1077-1082 (1998). Está cada vez mais claro que o risco de desenvolver muitos distúrbios comuns, e o metabolismo de medicações usadas para tratar essas condições, são substancialmente influenciados pelas variações genômicas subjacentes, embora os efeitos de qualquer uma variante possa ser pequeno.

Diz-se que um SNP é "alélico" no que, devido à existência do polimorfismo, alguns membros de uma espécie podem ter uma sequência imutável (*isto é*, o alelo original) muito embora outros membros possam ter

uma sequência mutante (*isto é*, o alelo mutante ou variante).

Uma associação entre um SNP e um fenótipo em particular não necessariamente indica ou exige que o SNP seja o causador do fenótipo. Em vez disso, a associação pode meramente ser devido à proximidade do

5       genoma entre um SNP e aqueles fatores genéticos realmente responsáveis por um dado fenótipo, de tal modo que o SNP e os ditos fatores genéticos são ligados de perto. Isto é, um SNP pode estar em desequilíbrio de ligação ("LD") com a "verdadeira" variante funcional. O LD (*a.k.a.*, associação alélica) existe quando os alelos em dois locais distintos do genoma são mais

10       elevadamente associados do que esperado. Dessa maneira, um SNP pode servir como um marcador que tem valor em virtude de sua proximidade a uma mutação que provoca um fenótipo em particular.

Ao descrever os locais polimórficos da invenção, é feito referência ao filamento sentido do gene por conveniência. Como reconhecido pela

15       pessoa versada, entretanto, as moléculas de ácido nucléico contendo o gene podem ser moléculas de filamento duplo complementar e, portanto, a referência a um local em particular no filamento sentido refere-se também ao local correspondente no lugar do filamento antisentido complementar. Isto é, a referência pode ser feita ao mesmo local polimórfico em qualquer filamen-

20       to, e um oligonucleotídeo pode ser designado para hibridizar especificamente qualquer filamento em uma região alvo contendo o local polimórfico. Dessa maneira, a invenção também inclui polinucleotídeos de filamento simples que são complementares ao filamento sentido das variantes genômicas descritas aqui.

25       *Identificação e Caracterização de SNPs.* Muitas técnicas diferentes podem ser usadas para identificar e caracterizar os SNPs, incluindo análise de polimorfismo de conformação de filamento simples (SSCP), análise heterodúplex pela desnaturação da cromatografia líquida de alto desempenho (DHPLC) e os métodos computacionais e sequencial do DNA diretos.

30       Shi *et al.*, *Clin. Chem.* 47:164-172 (2001). Existe uma riqueza de informações sequenciais em bancos de dados públicos.

Os métodos mais comuns de tipificação de SNP atualmente in-

cluem hibridização, extensão do iniciador e métodos de clivagem. Cada um desses métodos deve ser conectado a um sistema de detecção apropriado. As tecnologias de detecção incluem polarização fluorescente (Chan *et al.*, *Genome Res.* 9:492-499 (1999)), detecção luminométrica de liberação de pirofosfato (pirosequenciamento) (Ahmadiian *et al.*, *Anal. Biochem.* 280:103-10 (2000)), ensaios de clivagem com base em transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), DHPLC, e espectrometria de massa (Shi, *Clin. Chem.* 47:164-172 (2001); Patente Nº U.S. 6.300.076 B1). Outros métodos de detectar e caracterizar os SNPs são aqueles descritos nas Patentes U.S. Nºs 6.297.018 e 6.300.063.

Os polimorfismos podem também ser detectados usando produtos comercialmente disponíveis, tais como a tecnologia de INVADER® (disponível de Third Wave Technologies Inc. Madison, Wisconsin, USA). Nesse ensaio, um oligonucleotídeo "invasor" a montante específico, e uma sonda a jusante parcialmente em superposição, juntos, formam uma estrutura específica quando ligados a um modelo de DNA complementar. Essa estrutura é reconhecida e cortada em um local específico pela enzima Cleavase, resultando na liberação da aba de 5' do oligonucleotídeo da sonda. Esse fragmento, depois, serve como o oligonucleotídeo "invasor" com respeito aos alvos secundários sintéticos e sondas de sinal fluorescentemente rotuladas secundárias contidas na mistura de reação. Vide também, Ryan D *et al.*, *Molecular Diagnosis* 4(2): 135-144 (1999) e Lyamichev V *et al.*, *Nature Biotechnology* 17: 292-296 (1999), vide também Patentes U.S. Nºs 5.846.717 e 6.001.567.

A identidade dos polimorfismos pode também ser determinada usando uma técnica de detecção de combinação inadequada, mas não limitada, ao método de proteção de RNase usando ribossondas (Winter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7575 (1985); Meyers *et al.*, *Science* 230:1242 (1985)) e proteínas que reconhecem o nucleotídeo de combinações inadequadas, tal como a proteína *E. coli* mutS (Modrich P, *Ann Rev Genet* 25:229-253 (1991)). Alternativamente, os alelos variantes podem ser identificados por análise de polimorfismo de conformação de filamento simples (SSCP)

(Orita *et al.*, *Genomics* 5:874-879 (1989); Humphries *et al.*, em *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*, Elles R, ed., pp. 321-340 (1996)) ou desnaturando a electroforese de gel gradiente (DGGE) (Wartell *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 18:2699-2706 (1990); Sheffield *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236 (1989)). Um método extensão de iniciador mediado por polimerase pode também ser usado para identificar os polimorfismos. Diversos desses tais métodos têm sido descritos na patente e literatura científica e incluem o método de Genetic Bit Analysis (WO 92/15712) e a análise de bit genético mediado por ligase / polimerase (Patente U.S. Nº 5.679.524). Métodos relacionados são descritos em WO 91/02087, WO 90/09455, WO 95/17676, e nas Patentes U.S. Nºs 5.302.509 e 5.945.283. Iniciadores de extensão contendo um polimorfismo podem ser detectados por espectrometria de massa como descrito na Patente U.S. Nº 5.605.798. Outro método de extensão de iniciador é PCR alelo-específico (Ruafio *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 17:8392 (1989); Ruafio *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 19: 6877-6882 (1991); WO 93/22456; Turki *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:1635-1641 (1995)). Além disso, os locais polimórficos múltiplos podem ser investigados por simultaneamente amplificar regiões múltiplas do ácido nucléico usando conjuntos de iniciadores alelo- específicos como descrito do pedido de patente PCT publicado em WO 89/10414.

*Haplotipificação e Genotipificação de Oligonucleotídeos.* A invenção provê métodos e composições para haplotipificação e / ou genotipificação do gene em um indivíduo. Como usado aqui, os termos "genótipo" e "haplótipo" significam o genótipo ou haplótipo que contém o par de nucleotídeos ou nucleotídeo, respectivamente, que está presente em um ou mais dos novos locais polimórficos descritos aqui e podem opcionalmente também incluir o par de nucleotídeos ou nucleotídeo presentes em um ou mais locais polimórficos adicionais no gene. Os locais polimórficos adicionais podem ser locais polimórficos, correntemente conhecidos, ou locais que são subseqüentemente descobertos.

As composições da invenção contêm sondas e iniciadores de oligonucleotídeo projetadas para especificamente hibridizar uma ou mais



regiões alvo que contêm, ou que são adjacentes a um local polimórfico. Composições de oligonucleotídeos da invenção são úteis nos métodos para genotipificação e / ou haplotipificação de um gene em um indivíduo. Os métodos e composições para estabelecer o genótipo ou haplótipo de um indivíduo, nos novos lugares polimórficos descritos aqui, são úteis para estudar o efeito dos polimorfismos na etiologia das doenças afetadas pela expressão e função da proteína, estudar a eficácia de fármacos direcionados, predizendo a susceptibilidade do indivíduo às doenças afetadas pela expressão e função da proteína, e predizendo a responsividade do indivíduo aos fármacos direcionados para o produto de gene.

Oligonucleotídeos de genotipificação da invenção podem ser imobilizados ou sintetizados em uma superfície sólida tal como um microchip, conta, ou slide de vidro. Vide, *por exemplo*, WO 98/20020 e WO 98/20019.

Oligonucleotídeos de genotipificação podem hibridizar para uma região alvo localizada em um ou em diversos nucleotídeos; a jusante de um dos locais polimórfico novos identificados aqui. Tais oligonucleotídeos são úteis nos métodos de extensão de iniciador mediado por polimerase para detectar um dos novos polimorfismos descritos aqui e, portanto, tais oligonucleotídeos de genotipificação são referidos aqui como "oligonucleotídeos de extensão de iniciador".

*Método da Invenção de Genotipificação Direta.* Um método de genotipificação da invenção pode envolver o isolamento, a partir de um indivíduo, de uma mistura de ácido nucléico compreendendo as duas cópias de um gene de interesse, ou fragmento do mesmo, e determinação da identidade do par de nucleotídeos em um ou mais locais polimórficos nas duas cópias. Como será prontamente compreendido pela pessoa versada, as duas "cópias" de um gene em um indivíduo podem ser o mesmo alelo ou podem ser alelos diferentes. Em uma modalidade particularmente preferida, o método de genotipificação compreende a determinação da identidade do par de nucleotídeos em cada local polimórfico. Tipicamente, a mistura de ácido nucléico é isolada a partir de uma amostra biológica tirada do indivíduo, tal co-

mo uma amostra de sangue ou amostra de tecido. Amostras de tecido apropriadas incluem o sangue todo, semen, saliva, lágrimas, urina, material fecal, suor, esfregaços bucais, pele e cabelo.

No exemplo abaixo, os conjuntos de sondas de ensaio de polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) para ensaio de genotipificação foram gerados para a plataforma de ABI's Assays-by-Design®. Livak KJ, Marmaro J & Todd JA, *Nature Genetics* 9: 341-2 (1995). A identificação do genótipo foi executada em 10 ng de DNA genômico de acordo com as instruções do fabricante.

10                    *Método da Invenção de Haplotipificação Direta.* Um método de haplotipificação da invenção pode incluir o isolamento, a partir de um indivíduo, de uma molécula de ácido nucléico contendo somente uma das duas cópias de um gene de interesse, ou de um fragmento do mesmo, e determinação da identidade do nucleotídeo em um ou mais locais polimórficos na-  
15                    quella cópia. Os métodos de haplotipificação incluem, por exemplo, a tecnologia de CLASPER System® (Patente U.S. Nº 5.866.404) ou PCR de alelo-específico a longo prazo (Michalotos-Beloin *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 24: 4841-4843 (1996)). O ácido nucléico pode ser isolado usando qualquer método capaz de separar as duas cópias do gene ou fragmento. Como será  
20                    prontamente apreciado por aqueles versados na técnica, qualquer clone de indivíduo só fornecerá informações de haplótipo em uma das duas cópias de gene presentes em um indivíduo. Em uma modalidade, um par de haplótipos é determinado para um indivíduo identificando a seqüência de fases de nucleotídeos em um ou mais lugares polimórficos, em cada cópia do gene que  
25                    está presente no indivíduo. Em uma modalidade preferida, o método de haplotipificação compreende a identificação da seqüência de fase de nucleotídeos em cada local polimórfico, em cada cópia do gene.

Em ambos os métodos de genotipificação e haplotipificação, a identidade de um nucleotídeo (ou par de nucleotídeos) em um local polimórfico pode ser determinada ampliando as regiões alvo que contêm os locais polimórficos, diretamente a partir de uma ou de ambas as cópias do gene, ou fragmentos do mesmo, e sequenciando as regiões ampliadas pelos mé-

todos convencionais. O genótipo ou haplótipo para o gene de um indivíduo pode também ser determinado pela hibridização de uma amostra nucléica contendo um ou ambas as cópias do gene para os conjuntos ou subconjuntos de ácido nucléico tal como descrito em 95/11995.

5                    *Método de Genotipificação Indireta usando Locais Polimórficos em Desequilíbrio de Ligação com um Polimorfismo de Alvo.* Adicionalmente, a identidade dos alelos presentes em qualquer local polimórfico novo da invenção pode ser indiretamente determinada genotipificando outros locais polimórficos em desequilíbrio de ligação com aqueles locais de interesse.

10 Como descrito acima, dois locais são ditos em desequilíbrio de ligação se a presença de uma variante em particular em um local é indicativa da presença de outra variante em um segundo local. Stevens JC, *Mol. Diag.* 4: 309-317 (1999). Locais polimórficos em desequilíbrio de ligação com os locais polimórficos da invenção podem estar localizados em regiões do mesmo  
15 gene ou em outras regiões genômicas.

*Amplificando uma Região de Gene Alvo.* Tas regiões alvo pode ser amplificadas usando qualquer método de amplificação dirigido para o oligonucleotídeo, incluindo mas não limitado à reação em cadeia de polimerase (PCR). (Patente U.S. Nº 4.965.188), reação em cadeia de ligase (LCR)  
20 (Barany *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193 (1991); pedido de patente PCT publicado em WO 90/01069), e ensaio de ligação de oligonucleotídeo (OLA) (Landegren *et al.*, *Science* 241: 1077-1080 (1988)). Oligonucleotídeos úteis como iniciadores, ou sondas em que tais métodos devem especificamente hibridizar para uma região do ácido nucléico que contém ou é  
25 adjacente ao local polimórfico. Tipicamente, os oligonucleotídeos têm entre 10 e 35 nucleotídeos de comprimento e preferivelmente, entre 15 e 30 nucleotídeos de comprimento. Mais preferivelmente, os oligonucleotídeos têm 20 a 25 nucleotídeos de comprimento. O comprimento exato do oligonucleotídeo dependerá de muitos fatores que são rotineiramente considerados e  
30 praticados pela pessoa versada.

Outros procedimentos de amplificação de ácido nucléico conhecidos podem ser usados para amplificar a região alvo, incluindo sistemas de

amplificação a base de transcrição (Patente U.S. Nº 5.130.238; EP 329.822; Patente U.S. Nº 5.169.766, pedido de patente PCT publicado em WO 89/06700) e métodos isotérmicos (Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396 (1992)).

5                    *Hibridizando o Oligonucleotídeo Específico de Alelo para um Gene Alvo.* Um polimorfismo na região alvo pode ser ensaiado antes ou depois da amplificação usando um ou diversos métodos a base de hibridização conhecidos na técnica. Tipicamente, os oligonucleotídeos específicos de alelo são utilizados no desempenho de tais métodos. Os oligonucleotídeos  
10 específicos de alelo podem ser usados como pares de sondas rotulados diferentemente, com um membro do par mostrando uma combinação perfeita com uma variante ou uma sequência alvo e o outro membro mostrando uma combinação perfeita com uma variante diferente. Em algumas modalidades, mais de um local polimórfico pode ser detectado de uma vez usando um  
15 conjunto de oligonucleotídeos específicos de alelo ou pares de oligonucleotídeo. Preferivelmente, os membros do conjunto têm temperaturas de fusão dentro de 5°C, e mais preferivelmente dentro de 2°C, de cada um quando hibridizando para cada um dos locais polimórficos que estão sendo detectados.

20                    A hibridização de um oligonucleotídeo específico de alelo, para um polinucleotídeo alvo, pode ser desempenhada com ambas as entidades na solução, ou tal hibridização pode ser desempenhada quando tanto o oligonucleotídeo ou o polinucleotídeo alvo é covalentemente ou não covalentemente anexado como um suporte sólido. O acoplamento pode ser mediado, por exemplo, por interações de antígenos de anticorpo, poli-L-Lys, estreptavidin ou avidin-biotin, pontes de sal, interações hidrofóbicas, ligações químicas, ligação cruzada de UV, cozimento *etc.* O oligonucleotídeo específico de alelo pode ser sintetizado diretamente sobre o suporte sólido ou acoplado ao suporte sólido subsequente à síntese. Suportes sólidos apropriados  
25 para uso em métodos de detecção da invenção incluem substratos feitos de silicone, vidro, plástico, papel e os similares, que podem ser formados, por exemplo, dentro de cavidades (como em 96 cavidades), slides, folhas, mem-

branas, fibras, chips, pratos e contas. O suporte sólido pode ser tratado, revestido ou derivatisado para facilitar a imobilização do oligonucleotídeo específico de alelo ou o ácido nucléico alvo.

- Determinação de Genótipos e Haplótipos da População e a Correlação dos Mesmos com um Traço.* A invenção provê um método para determinar a freqüência de um genótipo ou haplótipo na população. O método compreende determinar o genótipo ou o haplótipo para um gene presente em cada membro da população, em que o genótipo ou haplótipo compreende o par de nucleotídeos ou nucleotídeo detectado em um ou mais dos locais polimórficos no gene, e calcular a freqüência em que o genótipo ou haplótipo é encontrado na população. A população pode ser uma população de referência, uma população de família, uma população do mesmo sexo, um grupo da população, ou uma população traço (*por exemplo*, um grupo de indivíduos exibindo um traço de interesse tal como uma condição médica ou resposta a um tratamento terapêutico).

- Em um outro aspecto da invenção, os dados de freqüência para genótipos e / ou haplótipos encontrados em uma população de referência são usados em um método para identificar uma associação entre um traço e um genótipo ou um haplótipo. O traço pode ser qualquer fenotipo detectável, incluindo mas não limitado à susceptibilidade a uma doença ou resposta a um tratamento. O método envolve obter os dados sobre a freqüência dos genótipos ou haplótipos de interesse em uma população de referência e comparar os dados com a freqüência dos genótipos ou haplótipos em uma população que exhibe o traço. Os dados da freqüência para uma ou ambas as populações de traço e de referência podem ser obtidos genotipificando ou haplotipificando cada indivíduo das populações usando um dos métodos descritos acima. Os haplótipos para a população traço podem ser determinados diretamente ou, alternativamente, por um genótipo previsível para a abordagem de haplótipo descrita acima.

- Os dados da freqüência para as populações de traço ou de referência são obtidos acessando dados de freqüência determinados previamente, que podem ser em forma escrita ou eletrônica. For exemplo, os dados da

freqüência podem estar presentes em um banco de dados que é acessível por computador. Uma vez obtidos os dados da freqüência, as freqüências dos genótipos ou haplótipos de interesse, nas populações de traço ou de referência, são comparados.

- 5 Quando os polimorfismos estão sendo analisados, um cálculo pode ser desempenhado para corrigir uma associação significativa que possa ser encontrada por acaso. Para métodos estatísticos úteis nos métodos da invenção, vide *Statistical Métodos in Biology*, 3<sup>rd</sup> edition, Bailey NTJ, (Cambridge Univ. Press, 1997); Waterman MS, *Introduction to Computational Biology* (CRC Press, 2000) e *Bioinformatics*, Baxevanis AD & Ouellette BFF editors (John Wiley & Sons, Inc., 2001).

- 10 Em outra modalidade, os dados da freqüência do haplótipo para grupos diferentes são examinados para determinar se eles são consistentes com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Hartl DL *et al.*, *Principles of População Genomics*, 3<sup>rd</sup> Ed. (Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1997).

- 15 Em outra modalidade, a análise estatística é desempenhada pelo uso de testes de ANOVA padrão com a correção de Bonferroni ou um método de autogeração que simula muitas vezes a correlação genótipo fenótipo, e calcula um valor de significância. A ANOVA é usada para testar hipóteses a respeito de se uma variável de resposta é causada por, ou é correlata com, um ou mais traços ou variáveis que podem ser medidas. Fisher LD & vanBelle G, *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences* (Wiley-interscience, New York, 1993) Ch. 10.

- 20 Em outra modalidade para prever um par de haplótipos, a análise inclui uma etapa de designação como a seguir: primeiro, cada um dos possíveis pares de haplótipos é comparado aos pares de haplótipos na população de referência. Geralmente, somente um dos pares de haplótipos na população de referência combina um possível par de haplótipos e àquele é designado para o indivíduo. Ocasionalmente, somente um haplótipo representado nos pares de haplótipos de referência é consistente com um possível par de haplótipos de um indivíduo, e em tais casos o indivíduo é designado para um par de haplótipos que contém esse haplótipo conhecido e um

novo haplótipo derivado pela subtração do haplótipo conhecido do possível par de haplótipos.

Em outra modalidade, um genótipo ou haplótipo detectável, que está em desequilíbrio de ligação com um genótipo ou haplótipo de interesse, pode ser usado como um marcador substituto. Um genótipo que está em desequilíbrio de ligação com outro genótipo é indicado quando um genótipo ou haplótipo particular, para um dado gene, é mais freqüente, na população que também demonstra o genótipo marcador substituto potencial, do que na população de referência. Se a freqüência é estatisticamente significativa, então o genótipo marcador é precursor daquele genótipo ou haplótipo, e pode ser usado como um marcador substituto.

Outro método para descobrir correlações entre o conteúdo de haplótipos e as respostas clínicas usa modelos precursores com base em algoritmos de otimização da minimização de erro, um dos quais é um algoritmo genético. Vide, Judson R, "Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry" em *Reviews in Computational Chemistry*, Ch. 10, Lipkowitz KB & Boyd DB, eds. (VCH Publishers, New York, 1997) pp. 1-73. Reconhecimento simulado (Press *et al.*, *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, Ch. 10 (Cambridge University Press, Cambridge, 1992), redes neurais (Rich E & Knight K, *Artificial Intelligence*, 2nd Edition, Ch. 10 (McGraw-Hill, New York, 1991), métodos descendentes gradientes padrão (Press *et al.*, *supra* Ch. 10), ou outras abordagens de otimização locais ou globais (vide discussão em Judson, *supra*) podem também ser usados.

No exemplo abaixo, estudos da associação de genótipo-fenótipo e análises relacionadas foram desempenhados em SAS (Cary, NC, USA) usando Analyst®. Testes de associação usaram genótipos categóricos como a variável independente, sem nenhuma suposição sobre dominância, e as diversas variáveis da eficácia como variáveis dependentes. Testes de variáveis dependentes contínuas usaram uma análise ANCOVA, e a regressão logística foi usada para variáveis dependentes categóricas. Co-variáveis na análise de associação genótipo-fenótipo foram: tratamento, região de traço e medição da linha de base. A análise ANCOVA foi repetida com o mesmo

modelo para cada grupo de tratamento. Além disso, o percentual de responders foi analisado por meio de um modelo de regressão logística com o tratamento e a região como fatores, e a linha de base como uma covariável. Associações com  $p < 0.05$  em todo o conjunto de dados foram consideradas significativas.

*Correlacionando o Genótipo ou Haplótipo do Sujeito com a Resposta ao Tratamento.* Em modalidades preferidas, o traço é susceptibilidade a uma doença, a gravidade de uma doença, o estágio de uma doença ou a resposta a um fármaco. Tais métodos têm aplicabilidade no desenvolvimento dos testes de diagnóstico e nos tratamentos terapêuticos para todas as aplicações farmacogenéticas em que existe o potencial para uma associação entre um genótipo e o resultado do tratamento, incluindo as medidas da eficácia, medidas farmacocinéticas e medidas dos efeitos colaterais.

Em outra modalidade preferida, o traço de interesse é uma resposta clínica exibida por um paciente para algum tratamento terapêutico, por exemplo, resposta para o direcionamento de um fármaco ou para um tratamento terapêutico para uma condição médica.

Para deduzir uma correlação entre uma resposta clínica para um tratamento e um genótipo ou haplótipo, os dados de genótipo ou haplótipo são obtidos nas respostas clínicas exibidas por uma população de indivíduos que receberam o tratamento, doravante a "população clínica". Esses dados clínicos podem ser obtidos pela análise dos resultados de um traço clínico que já foi processado e / ou projetando e realizando um ou mais testes clínicos novos.

Os indivíduos incluídos na população clínica são usualmente classificados pela existência da condição médica de interesse. Essa classificação de pacientes potenciais pode empregar um exame físico padrão, ou um ou mais testes de laboratório. Alternativamente, a classificação de pacientes poderá usar haplotipificação para situações em que existe uma forte correlação entre par de haplótipo e susceptibilidade ou gravidade da doença.

O tratamento terapêutico de interesse é administrado para cada indivíduo da população de traço, e a resposta de cada indivíduo para o tra-



tamento é medida usando um ou mais critérios predeterminados. É considerado que em muitos casos, a população traço exibirá uma faixa de respostas e que o investigador escolherá o número de grupos de responder (*por exemplo*, baixo, médio, alto) constituído pelas várias respostas. Além disso, o gene para cada indivíduo na população traço é genótipo e / ou haplótipo, que pode ser feito antes ou depois de administrar o tratamento.

Esses resultados são depois analisados para determinar se qualquer variação observada na resposta clínica entre grupos de polimorfismo é estatisticamente significativa. Métodos de análise estatística, que podem ser usados, são descritos em Fisher LD & vanBelle G, *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences* (Wiley-Interscience, New York, 1993). Essa análise pode também incluir um cálculo de regressão de quais locais polimórficos no gene contribuem mais significativamente para as diferenças em fenótipos.

Depois de serem obtidos ambos os dados, de polimorfismo e clínicos, são criados os conteúdos entre a resposta do indivíduo e o genótipo ou haplótipo. As correlações podem ser produzidas de várias maneiras. Em um método, os indivíduos são agrupados por seu genótipo ou haplótipo (ou par de haplótipos) (também referidos como um grupo de polimorfismo), e depois as médias e desvios padrão de respostas clínicas exibidas pelos membros de cada grupo de polimorfismo são calculadas.

A partir da análise descrita acima, a pessoa versada, que prediz a resposta clínica como uma função de conteúdo de genótipo ou haplótipo, pode prontamente construir um modelo matemático. A identificação de uma associação, entre uma resposta clínica e um genótipo ou haplótipo (ou para de haplótipos) para o gene, pode ser a base para designar um método de diagnóstico para determinar aqueles indivíduos que irão ou não irão responder ao tratamento, ou alternativamente, responderão em um nível mais baixo e, dessa maneira, requer mais tratamento, *isto é*, uma dose maior de um fármaco. O método de diagnóstico pode tomar uma ou diversas formas: for exemplo, um teste de DNA direto (*isto é*, genotipificar ou haplotipificar um ou mais dos locais polimórficos no gene), um teste sorológico, ou uma medição

do exame físico. O único requisito é que haja uma boa correlação entre os resultados do teste de diagnóstico e o genótipo ou haplótipo subjacente. Em uma modalidade preferida, esse método de diagnóstico usa o método haplotipificação preditiva descrito acima.

5                    *Designando um Sujeito para um Grupo de Genótipo.* Como uma pessoa versada na técnica compreenderá, haverá um certo grau de incerteza envolvido ao fazer essa determinação. Portanto, os desvios padrão dos níveis do grupo de controle seriam usados para fazer uma determinação probabilística e os métodos dessa invenção seriam aplicáveis sobre uma

10 ampla faixa de probabilidades com base nas determinações do grupo de genótipo. Assim sendo, por exemplo e não como uma forma de limitação, em uma modalidade, se o nível medido do produto de expressão do gene cai dentro dos desvios padrão de 2,5 da média de qualquer dos grupos de controle, então aquele indivíduo pode ser designado para aquele grupo de genótipo.

15 Em outra modalidade se o nível medido do produto de expressão do gene ficar dentro dos desvios padrão de 2,0 da média de qualquer dos grupos de controle, então aquele indivíduo pode ser designado para aquele grupo de genótipo. Em ainda outra modalidade, se o nível medido do produto de expressão do gene fica dentro dos desvios padrão de 1,5 da média de

20 quaisquer dos grupos de controle, então aquele indivíduo pode ser designado para aquele grupo de genótipo. Em ainda outra modalidade, se o nível medido do produto de expressão do gene são desvios padrão de 1,0 ou menos da média de quaisquer dos níveis dos grupos de controle então aquele indivíduo pode ser designado para aquele grupo de genótipo.

25                    Portanto esse processo permite a determinação, com vários graus de probabilidade, de qual o grupo em que um sujeito específico deve ser colocado, e tal designação para um grupo de genótipo deverá então determinar a categoria de risco em que o indivíduo deverá ser colocado.

Assim, este processo permite determinação, com vários graus

30 de probabilidade, no qual um sujeito específico de grupo deve ser colocado, e tal tarefa a um grupo genótipo, então, determinaria a categoria de risco no qual o indivíduo deve ser colocado.

*Correlação entre Resposta Clínica e Genótipo ou Haplótipo.* Para deduzir a correlação entre resposta clínica a um tratamento e um genótipo ou haplótipo, é necessário obter dados nas respostas clínicas exibidas por uma população de indivíduos que recebeu o tratamento, daqui para frente a "população clínica". Estes dados clínicos podem ser obtidos pela análise dos resultados de um exame clínico que já foi executado e/ou os dados clínicos podem ser obtidos pelo projeto e realização de um ou mais novos exames clínicos.

Os níveis de controle padrão do produto de expressão de gene, assim determinado nos diferentes grupos de controle, seriam comparados com o nível medido de um produto de expressão de gene em um dado paciente. Este produto de expressão de gene poderia ser o mRNA característico associado com aquele grupo genótipo particular ou o produto de expressão de gene polipeptídeo daquele grupo genótipo. O paciente poderia, então, ser classificado ou determinado a um grupo genótipo particular com base em quão similar os níveis medidos foram comparados aos níveis de controle para um dado grupo.

*Sistema de Computador para Armazenar ou Exibir Dados de Polimorfismo.* A invenção também provê um sistema de computador para armazenar e exibir dados de polimorfismo determinados para o gene. O sistema de computador compreende uma unidade de processamento de computador, um display, e uma base de dados contendo os dados de polimorfismo. Os dados de polimorfismo incluem os polimorfismos, os genótipos e os haplótipos identificados para um dado gene em uma população de referência. Em uma modalidade preferida, o sistema de computador é capaz de produzir um display mostrando haplótipos organizados de acordo com seus relacionamentos evolucionários. Um computador pode programar qualquer ou todas as operações analíticas ou matemáticas envolvidas em praticar os métodos da presente invenção. Além disso, o computador pode executar um programa que gera áreas de visão (ou telas) exibidas em um dispositivo de exibição e com o qual o usuário pode interagir para ver e analisar largas quantidades de informação com relação ao gene e suas variações genômi-

cas, incluindo localização do cromossoma, estrutura do gene e família do gene, dados de expressão do gene, dados de polimorfismo, dados de sequência genética, e dados de população clínica (*por exemplo*, dados em origem etnogeográfica, respostas clínicas, genótipos e haplótipos para uma ou mais populações). Os dados de polimorfismo descritos aqui podem ser armazenados como parte de uma base de dados relacional (*por exemplo*, uma solicitação de uma base de dados Oracle ou um conjunto de arquivos planos ASCII). Estes dados de polimorfismo podem ser armazenados no disco rígido do computador ou pode, por exemplo, ser armazenado em um CD-ROM ou em um ou mais outros dispositivos de armazenamento acessíveis pelo computador. Por exemplo, os dados podem ser armazenados em uma ou mais bases de dados em comunicação com o computador através de uma rede.

*Diagnósticos com base em Ácido Nucléico.* Em outro aspecto, a invenção provê sondas de SNP, as quais são úteis em classificar sujeitos de acordo com seus tipos de variação genética. As sondas de SNP de acordo com a invenção são oligonucleotídeos, que diferenciam entre SNPs em ensaios de diferenciação alélica convencional. Em certas modalidades preferidas, os oligonucleotídeos de acordo com este aspecto da invenção são complementares a um alelo do ácido nucléico de SNP, mas não a qualquer outro alelo do ácido nucléico. Oligonucleotídeos de acordo com esta modalidade da invenção podem diferenciar entre SNPs de várias maneiras. Por exemplo, sob condições de hibridização limitadas, um oligonucleotídeo de comprimento apropriado irá hibridizar a um SNP, mas não a qualquer outro. O oligonucleotídeo pode ser rotulado usando um radiorrótulo ou um marcador molecular fluorescente. Alternativamente, um oligonucleotídeo de comprimento apropriado pode ser usado como um iniciador para PCR, em que o nucleotídeo terminal 3' é complementar a um alelo contendo um SNP, mas não a qualquer outro alelo. Nesta modalidade, a presença ou ausência de amplificação por PCR determina o haplótipo do SNP.

Fragmentos genômicos e de cDNA da invenção compreendem pelo menos um novo local polimórfico identificado aqui, têm um comprimento

de pelo menos 10 nucleotídeos, e podem alcançar até o comprimento total do gene. Preferencialmente, um fragmento de acordo com a presente invenção está entre 100 e 3000 nucleotídeos de comprimento, e mais preferencialmente entre 200 e 2000 nucleotídeos de comprimento, e ainda mais preferencialmente entre 500 e 1000 nucleotídeos de comprimento.

*Kits da Invenção.* A invenção provê kits de detecção de ácido nucléico e polipeptídeo úteis para haplotipificação e/ou genotipificação do gene em um indivíduo. Tais kits são úteis para classificar indivíduos com a finalidade de classificar indivíduos. Especificamente, a invenção engloba kits para detectar a presença de um polipeptídeo ou ácido nucléico correspondendo a um marcador da invenção em uma amostra biológica, por exemplo, qualquer fluido corporal incluindo, mas não limitado a, soro, plasma, linfa, fluido cístico, urina, fezes, fluido cerebroespinal, líquido ascítico ou sangue, e incluindo amostras de biópsia do tecido do corpo. Por exemplo, o kit pode compreender um composto ou agente rotulado capaz de detectar um polipeptídeo ou um mRNA codificando um polipeptídeo correspondendo a um marcador da invenção em uma amostra biológica e meios para determinar a quantidade do polipeptídeo ou mRNA na amostra, *por exemplo*, um anticorpo que liga o polipeptídeo ou uma sonda de oligonucleotídeo que se liga ao DNA ou mRNA codificando o polipeptídeo. Kits podem, também, incluir instruções para interpretar os resultados obtidos usando o kit.

Em outra modalidade, a invenção provê um kit compreendendo pelo menos dois oligonucleotídeos de genotipificação embalados em recipientes separados. O kit pode também conter outros componentes, tais como tampão de hibridização (onde os oligonucleotídeos são para serem usados como uma sonda) embalado em um recipiente separado. Alternativamente, onde os oligonucleotídeos são para serem usados para amplificar uma região alvo, o kit pode conter, embalado em recipientes separados, uma polimerase e um tampão de reação melhorado para extensão do iniciador mediada pela polimerase, tal como no caso da PCR. Em uma modalidade preferida, tal kit pode ainda compreender uma amostra de DNA coletando recursos.

Para kits com base em anticorpos, o kit pode compreender, por

exemplo, (1) um primeiro anticorpo, por exemplo, preso a um suporte sólido, que liga a um polipeptídeo correspondendo a um marcador da invenção; e opcionalmente (2) um segundo, diferente anticorpo que liga ao polipeptídeo ou ao primeiro anticorpo e é conjugado a um rótulo detectável.

5           Para kits com base em oligonucleotídeos, o kit pode compreender, *por exemplo*, (1) um oligonucleotídeo, *por exemplo*, um oligonucleotídeo detectavelmente marcado, que hibridiza a uma sequência de ácido nucléico codificando um polipeptídeo correspondendo a um marcador da invenção; ou (2) um par de iniciadores úteis para amplificar uma molécula de ácido nucléi-

10       co correspondendo a um marcador da invenção.

          O kit pode também compreender, por exemplo, um agente de tamponamento, um conservante ou um agente de estabilização de proteína. O kit pode ainda compreender componentes necessários para detectar o rótulo detectável, por exemplo, uma enzima ou um substrato. O kit pode

15       também conter uma amostra de controle ou uma série de amostras de controle, que podem ser examinadas e comparadas à amostra de teste. Cada componente do kit pode ser incluído dentro de um recipiente individual e todos os vários recipientes podem estar dentro de uma embalagem única, junto com instruções para interpretar os resultados dos ensaios realizados u-

20       sando o kit.

*Seqüências de Ácido Nucléico da Invenção.* Em um aspecto, a invenção compreende um ou mais polinucleotídeos isolados. A invenção também engloba variantes alélicas do mesmo, isto é, formas alternativas de ocorrência natural dos polinucleotídeos isolados que codificam polipeptídeos

25       mutantes que são idênticos, homólogos ou relacionados àqueles codificados pelos polinucleotídeos. Alternativamente, variantes de ocorrência não-natural podem ser produzidas pelas técnicas de mutagênese ou por técnicas de síntese direta bem-conhecidas na técnica.

          Conseqüentemente, seqüências de ácido nucléico capazes de

30       hibridizar a baixa escassez com quaisquer seqüências de ácido nucléico codificando polipeptídeo mutante da presente invenção são consideradas como estando dentro do escopo da invenção. Condições de escassez padrão

são bem-caracterizadas em textos de clonagem de biologia molecular. Vide, por exemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed.*, Sambrook, Fritsch & Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); *DNA Cloning, Volumes I and II*, Glover DN, ed. (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, Gait MJ, ed. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames BD & Higgins SJ, eds. (1984).

*Caracterizando Nível de Expressão de Gene.* Métodos para detectar e medir níveis de mRNA (*isto é*, nível de transcrição de gene) e níveis de produtos de expressão de gene polipeptídeo (*isto é*, nível de tradução de gene) são bem-conhecidos na técnica e incluem o uso de microensaios de nucleotídeos e métodos de detecção de polipeptídeo envolvendo espectrômetros de massa e/ou detecção de anticorpo e técnicas de quantificação. Vide, também, Strachan T & Read A, *Human Molecular Genetics, 2<sup>nd</sup> Edition*. (John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York, 1999).

*Determinação de Transcrição de Gene Alvo.* A determinação do nível do produto de expressão do gene em uma amostra biológica, por exemplo, o tecido ou os fluidos corporais de um indivíduo, pode ser executada em uma variedade de formas. O termo "amostra biológica" tem a pretensão de incluir tecidos, células, fluidos biológicos e isolados do mesmo, de um sujeito, bem como tecidos, células e fluidos presentes dentro de um sujeito. Muitos métodos de detecção de expressão usam RNA isolado. Para métodos *in vitro*, qualquer técnica de isolamento de RNA que não seleciona contra o isolamento de mRNA pode ser utilizada para a purificação de RNA das células. Vide, por exemplo, Ausubel *et al.*, ed., *Curr. Prot. Mol. Biol.* (John Wiley & Sons, New York, 1987-1999).

Em uma modalidade, o nível do produto de expressão de mRNA do gene alvo é determinado. Métodos para medir o nível de um mRNA específico são bem-conhecidos na técnica e incluem análise Northern blot, PCR de transcrição reversa e PCR quantitativa de tempo real ou por hibridização a uma exposição ou microexposição de oligonucleotídeo. Em outras modalidades mais preferidas, a determinação do nível de expressão pode ser executada pela determinação do nível da proteína ou produto de expres-

são de polipeptídeo do gene nos fluidos corporais ou amostras de tecido incluindo, mas não limitado a, sangue ou soro. Grandes números de amostras de tecido podem facilmente ser processados usando técnicas bem-conhecidas àqueles versados na técnica, tal como, por exemplo, o processo  
5 de isolamento de RNA de etapa única da Patente US nº 4.843.155.

O mRNA isolado pode ser usada em ensaios de hibridização ou amplificação que incluem, mas não são limitados a, análises Southern ou Northern, análises de PCR e exposições de sonda. Um método diagnóstico preferido para a detecção de níveis de mRNA envolve colocar em contato o  
10 mRNA isolado com uma molécula de ácido nucléico (sonda) que pode hibridizar ao mRNA codificado pelo gene a ser detectado. A sonda de ácido nucléico pode ser, por exemplo, um cDNA de comprimento completo ou uma porção do mesmo, tal como um oligonucleotídeo de pelo menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ou 500 nucleotídeos de comprimento e suficiente para hibridizar  
15 especificamente sob condições limitadas a um mRNA ou DNA genômico codificando um marcador da presente invenção. Outras sondas adequadas para uso nos ensaios diagnósticos da invenção são descritos aqui. Hibridização de um mRNA com a sonda indica que o marcador em questão está sendo expresso.

20 Em um formato, as sondas são imobilizadas em uma superfície sólida e o mRNA é colocado em contato com as sondas, por exemplo, em um chip de exibição de gene Affymetrix (Affymetrix, Calif. USA). Um técnico versado pode facilmente adaptar métodos de detecção de mRNA conhecido para uso na detecção do nível de mRNA codificado pelos marcadores da  
25 presente invenção.

Um método alternativo para determinar o nível de mRNA correspondendo a um marcador da presente invenção em uma amostra envolve o processo de amplificação do ácido nucléico, por exemplo, por RT-PCR (a modalidade experimental apresentada na Patente US nº 4.683.202); reação  
30 de cadeia ligase (Barany *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193 (1991)) replicação de sequência auto prolongada (Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878 (1990)); sistema de amplificação transcriçio-



nal (Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177 (1989)); Replicase Q-Beta (Lizardi *et al.*, *Biol. Technology* 6: 1197 (1988)); replicação de círculo de rotação (Patente U.S. nº 5.854.033); ou qualquer outro método de amplificação de ácido nucleico, seguido pela detecção das moléculas amplificadas usando técnicas bem-conhecidas daqueles versados na técnica. Estes esquemas de detecção são especialmente úteis para a detecção das moléculas de ácido nucléico se tais moléculas estão presentes em números muito baixos. Como usado aqui, "iniciadores de amplificação" são definidos como sendo um par de moléculas de ácido nucléico que pode conciliar a regiões 5' ou 3' de um gene (mais e menos filamentos, respectivamente, ou vice-versa) e contém uma curta região entre eles. Em geral, iniciadores de amplificação estão entre cerca de 10 a 30 nucleotídeos de comprimento e flanqueiam uma região de cerca de 50 a 200 nucleotídeos de comprimento.

PCR quantitativa de tempo real (RT-PCR) é uma maneira de avaliar níveis de expressão de gene, por exemplo, de genes da invenção, por exemplo, aqueles contendo SNPs e polimorfismos de interesse. O ensaio de RT-PCR utiliza uma transcriptase reversa de RNA para catalisar a síntese de um filamento de DNA de um filamento de RNA, incluindo um filamento de mRNA. O DNA resultante pode ser especificamente detectado e quantificado, e este processo pode ser usado para determinar os níveis de espécies específicas de mRNA. Um método para fazer isto é TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) e explorar a atividade nuclease 5' de DNA polimerase AMPLITAQ GOLD® para clivar uma forma específica da sonda durante a reação de PCR. Isto é preferido como uma sonda de TAQMAN®. Vide Luthra *et al.*, *Am. J. Pathol.* 153: 63-68 (1998); Kuimelis *et al.*, *Nucl. Acids Symp. Ser.* 37: 255-256 (1997); e Mullah *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 26(4): 1026-1031 (1998)). Durante a reação, clivagem da sonda separa um corante repórter e um corante extintor, resultando em fluorescência aumentada do repórter. O acúmulo dos produtos de PCR é detectado diretamente pelo monitoramento do aumento na fluorescência do corante repórter. Heid *et al.*, *Genome Res.* 6(6): 986-994 (1996)). Quanto maior o início no número de cópia do ácido nucléico alvo, mais rápido um aumento significan-

te na fluorescência é observado. Vide Gibson, Heid & Williams *et al.*, *Genome Res.* 6: 995-1001 (1996).

- 5 Outras tecnologias para medir o estado transcricional de uma célula produzem pools de fragmentos de restrição de complexidade limitada para análise eletroforética, tal como métodos combinando dupla restrição de digestão de enzima com iniciadores de fase (vide, *por exemplo*, EP 0 534858 A1), ou métodos selecionando fragmentos de restrição com locais mais próximos a uma extremidade de RNA definida. (Vide, *por exemplo*, Prashar & Weissman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(2) 659-663 (1996)).
- 10 Outros métodos estatisticamente provam pools de cDNA, tais como pelo sequenciamento de bases suficientes, *por exemplo*, 20 a 50 bases, em cada um dos DNAs múltiplos para identificar cada cDNA, ou pelo sequenciamento de marcadores curtos, *por exemplo*, 9 a 10 bases, que são gerados em posições conhecidas com relação a um padrão definido de caminho de extremidade de mRNA. Vide, *por exemplo*, Velculescu, *Science* 270: 484-487 (1995). Os níveis de cDNA nas amostras são quantificados, e o desvio médio, proporcional e padrão de cada cDNA é determinado usando meios estatísticos padrão bem-conhecidos daqueles versados na técnica. Norman T.J. Bailey, *Statistical Methods In Biology, 3rd Edition* (Cambridge University Press, 1995).
- 15 20

*Deteção de Polipeptídeos. Métodos de Deteção Imunológica.*

Expressão da proteína codificada pelos genes da invenção pode ser detectada por uma sonda que é detectavelmente rotulada, ou que pode ser subsequentemente rotulada. O termo "rotulada", com relação à sonda ou anticorpo, tem a intenção de englobar rotulamento direto da sonda ou anticorpo, tem a intenção de englobar rotulamento indireto da sonda ou anticorpo por acoplamento, isto é, ligar fisicamente, uma substância detectável da sonda ou anticorpo, bem como rotulamento indireto da sonda ou anticorpo pela reatividade com outro reagente que é rotulado diretamente. Exemplos de rotulamento indireto incluem detecção de um anticorpo primário usando um anticorpo secundário fluorescentemente rotulado e rotulado na extremidade de uma sonda de DNA com biotina de modo que ele possa ser detectado com

25 30

estreptavidina fluorescentemente rotulada. Geralmente, a sonda é um anticorpo que reconhece a proteína expressa. Uma variedade de formatos pode ser empregada para determinar se uma amostra contém uma proteína alvo que liga a um dado anticorpo. Métodos de imunoensaio úteis na detecção de polipeptídeos alvo da presente invenção incluem, mas não são limitados a, por exemplo, "dot blotting", "western blotting", chips de proteína, ensaios de ligação de proteína competitiva e não-competitiva, ensaios imunossorvente ligado por enzima (ELISA), imuno-histoquímica, seleção de célula com fluorescência ativada (FACS), e outros comumente usados e amplamente descritos em literatura científica e de patente, e muitos empregados comercialmente. Um técnico versado pode facilmente adaptar métodos de detecção de proteína/anticorpo conhecidos para uso na determinação se as células expressam um marcador da presente invenção e a concentração relativa daquele produto de expressão de polipeptídeo específico no sangue ou outros tecidos do corpo. Proteínas de indivíduos podem ser isoladas usando técnicas que são bem-conhecidas daqueles versados na técnica. Os métodos de isolamento da proteína podem ser, por exemplo, tal como aqueles descritos em Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

Para a produção de anticorpos em uma proteína codificada por um dos genes descritos, vários animais hospedeiros podem ser imunizados através da injeção com o polipeptídeo, ou uma porção do mesmo. Tais animais hospedeiros podem incluir, mas não são limitados a, coelhos, camundongos e ratos. Diversos adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, a depender da espécie hospedeira, incluindo-se, mas não limitando-se a Freund's (completo e incompleto), géis minerais, tais como hidróxido de alumínio; substâncias tensoativas, tais como lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões oleosas, hemocianina específica de limulus e dinitrofenol; e adjuvantes humanos potencialmente úteis, tais como bacilo Camette-Guerin (BCG) e *Corynebacterium parvum*.

Anticorpos monoclonais (mAbs), que são populações homogêneas de anticorpos a um antígeno particular, podem ser obtidos por qualquer

técnica que proveja a produção de moléculas de anticorpo pelas linhagens de célula contínuas na cultura. Estes incluem, mas não são limitados à técnica de hibridoma de Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); e Patente U.S. nº 4.376.110; a técnica de hibridoma de célula B humana de Kosbor *et al.*, *Immunol. Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030 (1983); e a técnica de hibridoma EBV de Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (Alan R. Liss, Inc., 1985) pp. 77-96.

Além disso, podem ser usadas técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos" (vide Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608 (1984); e Takeda *et al.*, *Nature* 314: 452-454 (1985)), através da combinação de genes de uma molécula de anticorpos de camundongo de especificidade de antígeno apropriada com genes de uma molécula de anticorpo humano de atividade biológica apropriada. Um anticorpo quimérico é uma molécula em que diferentes porções são derivadas de diferentes espécies de animais, tais como aquelas tendo uma região variável ou hipervariável derivada de um murino mAb e uma região constante de imunoglobulina humana.

Alternativamente, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (Patente U.S. nº 4.946.778; Bird, *Science* 242: 423-426 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988); e Ward *et al.*, *Nature* 334: 544-546 (1989)) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única de gene diferentemente expressos.

Técnicas úteis para a produção de "anticorpos humanizados" podem ser adaptadas para produzir anticorpos às proteínas, fragmentos ou derivados dos mesmos. Tais técnicas estão descritas nas Patentes U.S. nºs 5.932.448; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; 5.530.101; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.661.016; e 5.770.429.

Anticorpos ou fragmentos de anticorpo podem ser usados em métodos, tais como Western blots ou técnicas de imunofluorescência para detectar as proteínas expressas. Em tais usos, é geralmente preferível imobilizar o anticorpo ou proteínas em um suporte sólido. Suportes ou veículos

de fase sólida adequados incluem qualquer suporte capaz de ligar um antígeno ou um anticorpo. Suportes ou veículos bem-conhecidos incluem, vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, náilon, amilases, celulosas naturais ou modificadas, poliacrilamidas, gabros e magnetita.

- 5 Um método útil, para facilitar a detecção, é o sanduíche ELISA, do qual várias variações existem, todas das quais têm a intenção de ser usadas nos métodos e ensaios da presente invenção. Como usado aqui, "ensaio de sanduíche" tem a intenção de englobar todas as variações na técnica básica de dois locais. Técnicas de imunofluorescência e EIA são ambas  
10 muito bem-estabelecidas na técnica. Entretanto, outras moléculas repórteres, tais como radioisótopos, moléculas quimioluminescente ou bioluminescente podem também ser empregadas. Será facilmente aparente ao técnico versado como variar o procedimento para adequar o uso requerido.

- Completo monitoramento de genoma da proteína, isto é, o "proteoma", pode ser realizado pela construção de uma microexibição na qual os  
15 locais de ligação compreendem anticorpos imobilizados, preferencialmente monoclonais, específicos a uma pluralidade de espécies de proteína codificadas pelo genoma da célula. Preferencialmente, anticorpos estão presentes por uma fração substancial das proteínas codificadas, ou pelo menos para  
20 aquelas proteínas relevantes para testar ou confirmar um modelo de rede biológica de interesse. Como citado acima, métodos para fabricar anticorpos são bem-conhecidos. Vide, *por exemplo.*, Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988). Em uma modalidade preferida, anticorpos monoclonais  
25 são destacados contra fragmentos de peptídeo sintéticos projetados com base na sequência genômica da célula. Com tal exibição do anticorpo, proteínas da célula são colocadas em contato com a exibição e sua ligação é medida com ensaios conhecidos na técnica.

#### *Detecção de Polipetídeos. Eletroforese de Gel Bidimensional.*

- 30 Eletroforese de gel bidimensional é bem-conhecida na técnica e tipicamente envolve foco isoeletrico junto com uma primeira dimensão seguida por eletroforese SDS-PAGE junto com uma segunda dimensão. Vide, por exemplo,

Hames *et al.*, *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach* (IRL Press, New York, 1990); Shevchenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14440-14445 (1996); Sagliocco *et al.*, *Yeast* 12: 1519-1533 (1996); e Lander, *Science* 274: 536-539 (1996).

- 5                    *Detecção de Polipetídeos. Espectroscopia de Massa.* A identidade bem como o nível de expressão do polipetídeo alvo pode ser determinada usando técnica de espectroscopia de massa (EM). Metodologia de análise com base em EM é útil para análise de polipetídeo alvo isolado bem como análise de polipetídeo alvo em uma amostra biológica. Formatos de
- 10 EM para uso na análise de um polipeptídeo alvo incluem técnica de ionização (I), tais como, mas não limitado a, dessorção à laser assistida com matriz (MALDI), ionização por eletropulverização contínua ou pulsada (ESI) e métodos relacionados, tais como íonpulverização ou termopulverização, e impacto de cluster massivo (MCI). Tais fontes de íons podem ser combina-
- 15 das com formatos de detecção, incluindo tempo de luz de reflexão linear ou não-linear (TOF), quadrupolo único e múltiplo, setor magnético único ou múltiplo, ressonância ciclotron de íon transform (FTICR), armadilha de íon e combinações dos mesmos tais como armadilha de íon/TOF. Para ionização, numerosas combinações de matriz/comprimento de onda (*por exemplo*, des-
- 20 ssorção à laser assistida com matriz (MALDI)) ou combinações de solvente (*por exemplo*, ESI) podem ser empregadas.

Para análise de espectroscopia de massa (EM), o polipeptídeo alvo pode ser solubilizado em uma solução apropriada ou sistema reagente. A seleção de uma solução ou sistema reagente, por exemplo, um solvente

25 orgânico ou inorgânico, irá depender das propriedades do polipeptídeo alvo e do tipo de EM executada, e é baseada nos métodos bem-conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Vorm *et al.*, *Anal. Chem.* 61: 3281 (1994) para MALDI; e Valaskovic *et al.*, *Anal. Chem.* 67: 3802 (1995), para ESI. EM de

30 peptídeos também é descrita, por exemplo, no Pedido de Patente PCT Internacional Nº WO 93/24834 e Patente U.S. Nº 5.792.664. Um solvente é selecionado para minimizar o risco de que polipeptídeo alvo será decomposto pela energia introduzida para o processo de vaporização. Um risco reduzido

da decomposição do polipeptídeo alvo pode ser alcançado, por exemplo, pela combinação da amostra em uma matriz. Uma matriz adequada pode ser um composto orgânico tal como açúcar, por exemplo, uma pentose ou hexose, ou um polissacarídeo tal como celulose. Tais compostos são de-

5 compostos termoliticamente em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  de modo que nenhum resíduo seja formado que possa levar a reações químicas. A matriz também pode ser um composto inorgânico, tal como nitrato de amônio, que é decomposto essencialmente sem nenhum resíduo. Uso destes e outros solventes é conhecido daqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Patente U.S. Nº.

10 5,062,935. Eletropulverização EM foi descrita por Fenn *et al.*, *J. Phys. Chem.* 88: 4451-4459 (1984); e Pedido de Patente PCT Nº WO 90/14148; e pedidos de patente atuais são resumidos em artigos de pesquisa. Vide, Smith *et al.*, *Anal. Chem.* 62: 882-89 (1990) e Ardrey, *Spectroscopy* 4: 10-18 (1992).

A massa de um polipeptídeo alvo determinada por EM pode ser

15 comparada à massa de um polipeptídeo conhecido correspondente. Por exemplo, onde o polipeptídeo alvo é uma proteína mutante, o polipeptídeo conhecido correspondente pode ser a proteína não-mutante correspondente, por exemplo, proteína tipo selvagem. Com ESI, a determinação dos pesos moleculares em quantidades de femtomole na amostra é muito precisa devido

20 à presença de múltiplos picos de íon, todos os quais podem ser usados para cálculo da massa. Níveis subatomoles da proteína foram detectados, por exemplo, usando ESI EM (Valaskovic *et al.*, *Science* 273: 1199-1202 (1996)) e MALDI EM (Li *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118: 1662-1663 (1996)).

*Dessorção à Laser Assistida com Matriz (MALDI).* O nível da

25 proteína alvo na amostra biológica, por exemplo, fluido corporal ou amostra de tecido, pode ser medido por meio de métodos espectrométricos de massa (EM) incluindo, mas não limitado àquelas técnicas conhecidas na técnica como dessorção/ionização à laser assistida com matriz, espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF-EM) e superfícies aumentadas para

30 dessorção/ionização à laser, espectrometria de massa tempo de voo (SELDI-TOF-EM) como mais detalhada abaixo. Métodos para executar MALDI são bem-conhecidos daqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Ju-

hasz *et al.*, *Analysis, Anal. Chem.* 68: 941-946 (1996), e vide também, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.777.325; 5.742.049; 5.654.545; 5.641.959; 5.654.545 e 5.760.393 para descrições de MALDI e protocolos de extração atrasada. Numerosos métodos para melhorar a resolução são também conhecidos. MALDI-TOF-EM foi descrito por Hillenkamp *et al.*, *Biological Mass Spectrometry*, Burlingame & McCloskey, eds. (Elsevier Science Publ., Amsterdam, 1990) pp. 49-60.

Uma variedade de técnica para detecção de marcador usando espectroscopia de massa pode ser usada. Vide *Bordeaux Mass Spectrometry Conference Report*, Hillenkamp, ed., pp. 354-362 (1988); *Bordeaux Mass Spectrometry Conference Report*, Karas & Hillenkamp, eds., pp. 416-417 (1988); Karas & Hillenkamp, *Anal. Chem.* 60: 2299-2301 (1988); e Karas *et al.*, *Biomed. Environ. Mass Spectrum* 18: 841-843 (1989). O uso de raios laser em TOF-EM é mostrado, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 4.694.167; 4.686.366, 4.295.046 e 5.045.694, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade. Outras técnicas de EM permitem a volatilização bem-sucedida de biopolímeros de alto peso molecular, sem fragmentação, e tem permitido a ampla variedade de macromoléculas biológicas para serem analisadas por espectrometria de massa.

*Superfícies Melhoradas para Dessorção/Ionização à Laser (SELDI)*. Outras técnicas são usadas empregando novas composições de elemento de sonda de EM com superfícies que permitem os elementos de sonda participarem ativamente na captura e ancoragem de analitos específicos, descritos como Espectrometria de Massa por Afinidade (EMA). Vide patentes SELDI: Patentes U.S. Nºs 5.719.060; 5.894.063; 6.020.208; 6.027.942; 6.124.137; e pedido de patente U.S. publicado Nº U.S. 2003/0003465. Vários tipos de novos elementos de sonda de EM foram projetados com Superfícies Melhoradas para Captura de Afinidade (SEAC). Vide Hutchens & Yip, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7: 576-580 (1993). Elementos de sonda SEAC foram usados com sucesso para devolver e amarrar diferentes classes de biopolímeros, proteínas particulares pela exploração do que é conhecido a cerca das estruturas da superfície da proteína e



identificação molecular bioespecífica. Os dispositivos de captura de afinidade imobilizados na superfície de elemento de sonda de EM, isto é, SEAC, determina a localização e afinidade (especificidade) do analito para a superfície de sonda, então o processo de EM analítica subsequente é eficaz.

- 5                   Dentro da categoria geral de SELDI estão três subcategorias separadas: (1) Superfícies Melhoradas para Dessorção Pura (SEND), onde as superfícies de elemento de sonda, isto é, meios apresentando amostra, são projetadas para conter Moléculas de Absorção de Energia (EAM) em vez de "matriz" para facilitar dessorção/ionizações de analitos diretamente
- 10                   (puro) da superfície. (2) SEAC, onde as superfícies do elemento de sonda, isto é, meios apresentando amostra, são projetadas para conter dispositivos de captura de afinidade quimicamente definidos e/ou biologicamente definidos para facilitar a conexão específica ou não-específica ou absorção (assim chamado ancoragem ou amarração) de analitos na superfície da sonda, por
- 15                   uma variedade de mecanismos (geralmente não-covalente). (3) Superfícies Melhoradas para Conexão e Liberação Fotolábil (SEPAR), onde as superfícies de elemento de sonda, isto é, meios apresentando amostra, são projetadas ou modificadas para conter um ou mais tipos de moléculas de reticulação quimicamente definidas para servir como dispositivos de ancoragem
- 20                   covalente. As especificidades químicas determinando o tipo e número dos pontos de conexão de molécula fotolábil entre os meios apresentando amostra de SEPAR (*isto é*, superfície de elemento de sonda) e o analito (*por exemplo*, proteína) podem envolver qualquer um ou mais de vários resíduos diferentes ou estruturas químicas no analito (*por exemplo*, resíduos His, Lys,
- 25                   Arg, Tyr, Phe e Cys no caso de proteínas e peptídeos).

*Outros Aspectos do Estado Biológico.* Em várias modalidades da invenção, aspectos do estado da atividade biológica ou aspectos misturados podem ser medidos para obter fármaco ou respostas de caminho. As atividades das proteínas, relevantes para a caracterização da função da célula, podem ser medidas, e as modalidades desta invenção podem ser baseada

30                   em tais medições. Medições de atividade podem ser executadas por qualquer meio funcional, bioquímico ou físico apropriado à atividade sendo ca-

racterizada. Onde a atividade envolve uma transformação química, a proteína celular pode ser colocada em contato com substratos naturais, e a taxa de transformação medida. Onde a atividade envolve associação em unidades multiméricas, por exemplo, associação de um complexo de ligação de DNA ativado com DNA, a quantidade de proteína associada ou consequências secundárias da associação, tais como quantidades de mRNA transcritas, pode ser medida. Também, onde apenas uma atividade funcional é conhecida, por exemplo, como em controle de ciclo de célula, desempenho da função pode ser observada. Entretanto, conhecidas e medidas, as mudanças nas atividades da proteína formam os dados de resposta analisados pelos métodos desta invenção. Em modalidades alternativas e não-limitantes, dados de resposta podem ser formados de aspectos misturados do estado biológico de uma célula. Dados de resposta podem ser construídos de, por exemplo, mudanças em certas abundâncias de proteína e mudanças em certas atividades da proteína.

O exemplo seguinte é apresentado para ilustrar mais completamente as modalidades preferidas da invenção. Este exemplo não deve de maneira alguma ser construído como limitante do escopo da invenção, como definido pelas reivindicações anexas.

## 20 Exemplo

### Comparação de Aliskiren com Placebo e Irbesartan em Pacientes com Hipertensão Essencial Leve a Moderada

*Introdução e sumário.* Uma análise farmacogenética retrospectiva foi conduzida em uma tentativa de avaliar associação potencial entre variação genética e resultado clínico em uma estudo clínico. Especificamente, 48 polimorfismos foram examinados em 12 genes do sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAS) ou previamente envolvidos na regulação da pressão sanguínea. Associações significativas foram vistas entre um polimorfismo no gene de enzima de conversão de angiotensina (ACE), dois polimorfismos no gene receptor tipo 2 de angiotensina II (AGTR2), e parâmetros clínicos de recurso de conferência da diminuição da pressão sanguínea diastólica ou sistólica. Estes efeitos não foram encontrados com tratamento

de irbesartan e placebo, uma vez que eles não foram específicos ao tratamento com aliskiren nesta análise.

*O estudo clínico.* Um estudo clínico multicentralizado, aleatório, duplo cego, grupo paralelo foi executado para explorar a eficiência e segurança de aliskiren comparado com placebo em uma população de pacientes hipertensivos de leve a moderado. O tratamento foi por oito semanas, isto é, o ponto final do estudo clínico foi em oito semanas para este estudo particular. O objetivo principal do estudo foi determinar os efeitos da diminuição da pressão sangüínea de aliskiren de 150 mg, aliskiren de 300 mg, e aliskiren de 600 mg comparado com 150 mg de irbesartan e placebo em pacientes com hipertensão essencial de leve a moderada. As características demográficas foram geralmente comparáveis através dos grupos de tratamento. A maioria dos pacientes eram caucasianos e mais jovens que 65 anos de idade, com uma idade média de 50 anos. A distribuição geral dos homens e das mulheres foi par.

A variável de eficácia primária analisada foi a mudança de MSDBP (redução em MSDBP da linha de base). As variáveis de eficácia secundária analisadas foram mudanças de MSSBP (redução em MSSBP da linha de base), razão de responder, redução da atividade de renina de plasma (PRA) e aumento da resina de plasma ativa (AREN) da linha de base.

Com relação da eficácia primária, comparações "pairwise" mostraram que todas as doses do tratamento ativo foram estatisticamente superior ao placebo na redução da conferência da pressão sangüínea diastólica (MSDBP) no Ponto Final e na Semana na população com pretensão de tratamento (ITT), e no Ponto Final na população de protocolo per. Reduções de MSDBP similares foram alcançadas com aliskiren de 150 mg e irbesartan de 150 mg. Aliskiren de 300 e 600 mg produziram as maiores reduções, mas grandes reduções não foram observadas com a dose de 600 mg.

Com relação à eficácia secundária, para meio de conferência da pressão sangüínea (MSSBP), todas as doses do tratamento ativo foram estatisticamente superiores ao placebo no Ponto Final na Semana 8, aliskiren de 300 e 600 mg foram estatisticamente superiores ao placebo e irbesartan

no Ponto Final. Reduções de MSSBP similares foram alcançadas com aliskiren de 150 mg e irbesartan de 150 mg. Aliskiren de 300 e 600 mg produziram as maiores reduções, mas grandes reduções não foram observadas com a dose de 600 mg.

5                    Para a proporção de responders (definido como MSDBP < 90 mm Hg ou uma redução de  $\geq 10$  mm Hg da linha de base; ou MSSBP < 140 mm Hg ou uma redução de  $\geq 20$  mm Hg da linha de base) mostrou que todos os tratamentos ativos foram estatisticamente superiores ao placebo em Endpoint. Os resultados de MSDBP para a população ITT em Endpoint foram de  
10 59-67% responders para os grupos de aliskiren versus 56% para irbesartan e 38% para placebo. Os resultados de MSSBP para a população ITT em Endpoint foram de 57-68% responders para os grupos de aliskiren versus 59% para irbesartan e 36% para placebo. Na população ITT, os aumentos médios relacionados à dose em renina ativa foram observados nos grupos  
15 de aliskiren (20,8, 29,9 e 93,6 mu/mL para aliskiren 150, 300 e 600 mg, respectivamente). O Aliskiren 150 mg produziu um aumento médio maior em renina do que o irbesartan 150 mg (11,2 mu/mL). Isso é consistente com o mecanismo de ação para os inibidores de renina.

Pediu-se aos pacientes que participaram do estudo clínico para  
20 fornecerem um consentimento separado para participação em análise farmacogenética. Amostras de sangue de todos os pacientes que consentiram foram coletadas em locais de estudo clínico individual e depois enviadas para Covance (Indianápolis, IN, USA). O DNA genômico de cada paciente foi extraído do sangue por Covance usando o Kit de Isolamento de DNA PU-  
25 REGENE® (D-50K) (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA). Por último, 511 pacientes foram genotipados, com relações aproximadamente iguais de cada ramo de tratamento.

*Objetivos e projeto da Análise Farmacogenética.* Foram conduzidas análises farmacogenéticas retrospectivas em todos os pacientes que  
30 tinham consentido em fornecer amostras para investigação farmacogenética. O objetivo principal foi identificar associações entre variação e variações genéticas na eficácia do tratamento com aliskiren, acessadas primeiramente

por MSDBP e secundariamente por MSSBP e relação de responder.

Uma abordagem de gene candidato foi usada para selecionar 48 polimorfismos em 12 genes do sistema de angiotensina renina (RAS) ou previamente associados com a regulação da pressão arterial (tabela 1). Todas as amostras disponíveis foram genotipadas para cada SNP. Estudos de associação foram então desempenhados como descrito abaixo.

Tabela 1

Genes Candidatos Selecionados para Análise Farmacocinética

<u>Gene Símbolo</u>	<u>Nome do Gene</u>
RENBP	proteína de ligação de renina
REN	Renina
	enzima de conversão de angiotensina I
ACE	(peptidil-dipeptidase A) 1
	enzima de conversão de angiotensina I
ACE2	(peptidil-dipeptidase A) 2
AGT	angiotensinogen
AGTR1	receptor de angiotensina II, tipo 1
AGTR2	receptor de angiotensina II, tipo 2
	cassette de ligação de ATP, subfamília C
ABCC2/MRP2	(CFTR/MRP), membro 2
AGTRAP	proteína associada ao receptor de angiotensina II
	citocromo P450, família 11, subfamília B, polipeptídeo 2,
CYP11B2	aldosterona sintase
TGFB1	fator de crescimento de transformação, beta 1
NOS3/eNOS	Sintase de óxido nítrico 3 (célula endotelial)

*Genotipificação.* Ensaios de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) foram designados usando informação da base de dados pública dbSNP e a base de dados Celera/ABI proprietária. Os conjuntos de sonda resultante para o ensaio de genotipificação foram gerados pela plataforma ABI's Assays-by-Design® platform. Livak KJ, Marmaro J, & Todd JA, *Nature Genetics* 9: 341-2 (1995). Genotipificação foi executada em 10 ng de DNA genômico de acordo com as instruções do fabricante.

A lista de polimorfismos genotipados nesta análise, incluindo código do local de CGP interno, gene, caminho, referência de banco de da-

dos e efeito, é dada na tabela 2.

Tabela 2A

Polimorfismos Genotipados

<u>pg_local_id</u>	<u>Gene</u>	<u>rs_número</u>	<u>Descrição</u>
5284	ABCC2	hCV11305436	intrônico
4786	ABCC2	rs2273697	A>G I417V
4783	ABCC2	rs2756104	intrônico
4784	ABCC2	rs2756109	intrônico
4785	ABCC2	rs3740066	T>C I1324I
4782	ABCC2	rs717620	não traduzido
4797	ABCC2	rs8187710	A>G Y1515C
5286	ACE	hCV1247681	intrônico
4766	ACE	rs4293	intrônico
4769	ACE	rs4317	C>T P32S
4767	ACE	rs4329	intrônico
4768	ACE	rs4362	C>T F1129F
400	ACE	rs4364	A>C S712R
1345	ACE		ins/del
4746	ACE2	rs2285666	intrônico
1669	ACE2	rs879922	intrônico
4773	AGT	rs1926723	intrônico
1667	AGT	rs4762	T>C M207T
2	AGT	rs699	C>T T268M
4772	AGT	rs943580	genômico
4796	AGTR1	rs2638362	intrônico
4780	AGTR1	rs3772616	intrônico
411	AGTR1	rs5182	C>T L191L

Tabela 2BPolimorfismos Genotipados

<u>pg_local_id</u>	<u>Gene</u>	<u>rs_número</u>	<u>Descrição</u>
5287	AGTR2	hCV1841569	
1445	AGTR2	rs1403543	Não traduzido
186	AGTR2	rs5193	Não traduzido
4795	AGTR2-LD	rs4497127	genômico
5288	AGTRAP	hCV516817	intrônico
4787	AGTRAP	rs4073574	genômico
4789	CYP11B2	rs4539	G>A R173K
575	CYP11B2	rs4544	C>T T339I
4788	CYP11B2	rs4545	A>G S435G
3541	CYP11B2	rs6431	intrônico
4792	NOS3	rs1007311	intrônico
482	NOS3	rs1799983	G>T E298D
4791	NOS3	rs1800779	genômico
4464	NOS3	rs1800780	intrônico
4793	NOS3	rs891512	intrônico
5292	REN	rs11571092	intrônico
1513	REN	rs1464816	intrônico
4771	REN	rs3730103	intrônico
4794	REN	rs6704321	C>G P403A
4770	RENB	rs2269371	G>A G274D
2407	RENB	rs2269372	intrônico
1676	RENB	rs762656	genômico
5285	TGFB1	hCV11707868	intrônico
4790	TGFB1	rs2241717	intrônico
4798	TGFB1	rs8105161	intrônico

*Análise estatística.* Estudos de associação de genótipo-fenótipo e análises relacionadas foram realizados em SAS (Cary, NC, USA) usando

Analyst®.

Testes de associação usaram genótipos categóricos como a variável independente, com nenhuma suposição sobre a dominância, e as várias variáveis de eficácia como variáveis dependentes. Os testes de variáveis dependentes contínuas usaram uma análise ANCOVA, e a regressão logística foi usada para variáveis dependentes categóricas. As co-variáveis na análise de associação de genótipo-fenótipo foram: tratamento, região de estudo e medição de linha de base.

A análise ANCOVA foi repetida com o mesmo modelo para cada grupo de tratamento. Além disso, a percentagem de responders foi analisada por meio de um modelo de regressão logístico com tratamento e região como fatores e linha de base como uma co-variável. As associações com  $p < 0,05$  no conjunto de dados completo foram consideradas significativas.

*Enzima de conversão de angiotensina (ACE).* Ang I é convertida no octapeptídeo ativo Ang II pela enzima de conversão de angiotensina (ACE). SNP\_4769 foi genotipado nos pacientes junto com seis outros polimorfismos nesta enzima crítica no RAS. Associação significativa foi vista entre SNP\_4769 e a variável de eficácia principal de redução de MSDBP a partir da linha de base ( $p=0,0058$ ), e com a variável secundária da relação de responder ( $p=0,001$ ). Para a outra variável secundária de redução de MSSBP a partir da linha de base, não houve associação significativa, mas apenas a mesma tendência vista ( $p=0,0745$ ).

Quando a análise ANCOVA foi repetida para cada grupo de tratamento, a associação foi apenas detectada para os grupos tratados com aliskiren, mas não os grupos ibesartan ou placebo. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre quaisquer SNPs e os parâmetros secundários da atividade de renina de plasma (PRA) e da renina ativa (AREN). Os efeitos específicos do aliskiren são mostrados na tabela 3.



Tabela 3

Efeito de Variações de ACE e AGTR2 sobre MSDBP, MSSBP Relação de Responder nos Grupos Tratados com Aliskiren

	SNP 4769			SNP 1445			SNP 4795		
	<u>TT</u>	<u>CT</u>	<u>CC</u>	<u>AA</u>	<u>AG</u>	<u>GG</u>	<u>GG</u>	<u>GA</u>	<u>AA</u>
n	278	14	0	106	69	118	106	72	115
Redução de MSDBP (mmHg)	-11,1	-4,7	NA	-11,2	-13,2	-9,3	-11,1	-13,3	-9,0
p		0,0058*			0,0074*			0,0022*	
Redução de MSSBP	-13,7	-6,2	NA	-13,9	-15,7	-11,8	-13,6	-16,3	-11,5
p		0,0384*			0,1360			0,0479*	
Relação de Res-ponder	69%	14%	NA	74%	71%	58%	74%	73%	56%
p		0,0024*			0,1399			0,0382*	

5 SNP\_4769 é um SNP de codificação que muda a seqüência de aminoácido de prolina para serina no códon 32 na enzima ACE. O polimorfismo ACE I/D (presença ou ausência de uma seqüência de repetição Alu de 287 pb no íntron 16) tem sido associado com a regulação do nível e da atividade de ACE e suas ramificações no RAS. Rigat B *et al.*, *J. Clin. Invest.* 86(4): 1343-6 (1990).

10 *Receptor de Angiotensina II, tipo 2 (AGTR2)*. AGTR2 codifica o receptor de angiotensina II, tipo II. O receptor de angiotensina II do tipo I é o alvo de vários fármacos anti-hipertensivos. Os sinais de Ang II através da ligação ao receptor do tipo I para induzir o aumento da vasoconstrição e da pressão arterial. O receptor de angiotensina II do tipo II tem sido mostrado inibir a atividade de ACE e atenuar as ações mediadas pelo receptor do tipo I, desse modo causando a vasodilatação. Hunley TE *et al.*, *Kidney Int.* 57(2): 570-7 (2000); Ichiki T *et al.*, *Nature* 377(6551): 748-50 (1995).

15 A associação significativa foi vista entre os AGTR2 SNPs (SNP\_1445 e SNP\_4795) e a variável de eficácia principal de redução de MSDBP a partir da linha de base (p=0,0078 e 0,0004 respectivamente). SNP\_4795 também demonstrou associação significativa com a variável se-

cundária de redução de MSSBP a partir da linha de base ( $p=0,0245$ ), mas não com o outro parâmetro secundário de relação de responder. SNP\_1445 neste íterim não mostrou associação significativa com os parâmetros secundários. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre quaisquer

5 SNPs e os parâmetros secundários da atividade de renina de plasma (PRA) e renina ativa (AREN).

Quando a análise ANCOVA foi repetida para cada grupo de tratamento, a associação foi apenas detectada para os grupos tratados com aliskiren, mas não os grupos ibesartan ou placebo. Os efeitos do genótipo

10 nos pacientes tratados com aliskiren são mostrados acima na tabela 3.

Ambos os SNPs são de não codificação. SNP\_1445 está na região não traduzida do gene AGTR2, e SNP\_4795 está na região genômica com desequilíbrio de ligação ao gene AGTR2.

*Discussão.* Em sumário, uma variante no gene ACE e dois SNPs

15 no gene AGTR2 mostraram associação significativa com o principal parâmetro MSDBP. A variante de ACE e uma das variantes de AGTR2 também mostraram associação significativa com os parâmetros secundários de MSSBP e a relação de responder. A segunda variante de AGTR2 não mostrou associação significativa, mas apenas a mesma tendência aos parâ-

20 metros secundários. Este efeito do genótipo foi apenas visto nos grupos tratados com aliskiren, mas não nos grupos ibesartan ou placebo. Portanto, o efeito descrito acima é um efeito farmacogenético específico de aliskiren.

O efeito da variante de ACE é particularmente interessante devido à diferença entre os genótipos de TT e CT parecer um tanto quanto dramática (redução de MSDBP 11,1 vs 4,7 mm de Hg, redução de MSSBP 13,7

25 vs 6,2 mm de Hg, e relação de responder 69% vs 14%). Nenhum genótipo de homozigoto CC foi visto dentre os pacientes, o que torna a frequência do alelo detectada mais inferior do que a frequência do alelo reportado SNP DB de 0,1.

30 Ao segregar a resposta de aliskiren por genótipo, a relação de resposta para o genótipo aumenta até aproximadamente 70%. A implicação é que este resultado pode ajudar a envenenar o aliskiren no mercado anti-

hipertensivo congestionado ao suportar a maioria da população geral (cerca de 80% de acordo com a frequência do alelo SNP DB, mas pode ainda ser maior como visto nesta análise) tendo melhor relação de resposta, como mostrado na figura 1. Ele pode também prover uma maneira de ajudar a recrutar responders potencialmente "melhores" a aliskiren nos estudos futuros.

Os dois SNPs no gene AGTR2 estão muito provavelmente em desequilíbrio de ligação.

Os SNPs reportados não mostraram associação com as medições de linha de base de MSDBP e MSSBP, novamente sugerindo que o efeito genético é um efeito farmacogenético relacionado a aliskiren.

### Exemplo II

#### Análise da Farmacogenética Clínica para o Estudo Clínico de A2203

*Introdução e Sumário.* Uma análise da farmacogenética retrospectiva foi conduzida em uma tentativa de avaliar a associação potencial entre a variação genética e os resultados clínicos em um estudo clínico. Vide, EXEMPLO I. Subseqüentemente, os resultados de um outro estudo clínico (A2203) foram considerados para a análise de replicação. Especificamente, foram examinados 48 polimorfismos em 12 genes a partir do sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAS) ou previamente implicados na regulação de pressão arterial.

No exemplo I, associações significativas foram vistas entre um polimorfismo no gene da enzima de conversão de angiotensina (ACE), dois polimorfismos no gene do receptor de angiotensina II do tipo 2 (AGTR2), e os parâmetros clínicos de redução da pressão arterial diastólica e sistólica média em repouso. Estes efeitos não foram encontrados no tratamento com irbesartan e placebo. Adicionalmente, para a variante ("missense") de ACE (Pro32Ser) associada com resposta reduzida, verificou-se uma frequência de alelo C (Pro) muito mais alta em negros do que em caucasianos (19/154 vs. 2/790).

Neste exemplo, todos os quatro pacientes com o resíduo serina (alelo C) eram negros. Devido ao número extremamente baixo de pacientes com alelo C, uma análise não poderia ser conduzida para este SNP com o

mesmo modelo como no exemplo. Além disso, a associação dos dois SNPs no AGTR2 encontrado no exemplo I não foi replicada.

O estudo clínico neste exemplo (A2203) foi um estudo de grupo paralelo, aleatório, duplo cego, multicentralizado, multifatorial, placebo-controlado para avaliar a eficácia e a segurança de combinações de aliskiren e valsartan em comparação às suas monoterapias de componente e a combinação de valsartan e hidroclorotiazida (HCTZ) em pacientes hipertensos. Os objetivos principais deste exemplo foram acessar os efeitos de redução da pressão arterial da combinação de aliskiren e valsartan (75/80 mg, 150/160 mg e 300/320 mg) em comparação às suas monoterapias de componente administradas por 6 semanas em pacientes com pressão arterial diastólica média em repouso clínica ([MSDBP]  $\geq 95$  mm de Hg e  $< 110$  mm de Hg) e acessar os efeitos de redução da pressão arterial de aliskiren 75 mg, 150 mg e 300 mg dados sozinhos versus placebo administrado por 6 semanas em pacientes com pressão arterial diastólica média em repouso clínica ([MSDBP]  $\geq 95$  mm de Hg e  $< 110$  mm de Hg). Os grupos de tratamento foram geralmente comparáveis em características demográficas e linha de base, com idade média de 56 anos, 56% de machos e 6,8 % de negros.

A variável de eficácia principal, mudança de linha de base em MSDBP para monoterapia com aliskiren vs. placebo, foi estatisticamente significativa para o grupo de aliskiren a 300 mg. A magnitude total da redução de pressão sanguínea para ambas as monoterapias foi consistente com aquela vista nos estudos anteriores. A magnitude do efeito do placebo entretanto, maior do que esperado e maior do que aquele visto nos estudos com aliskiren anteriores. A redução da pressão sanguínea com a combinação de aliskiren e valsartan foi menor do que aquela observada com hidroclorotiazida (HCTZ) 12,5 mg/valsartan, e a aditividade foi menor na dose máxima de aliskiren 300 mg/valsartan 320 mg do que nas combinações de resistência inferior.

*Objetivos da Análise Farmacogenética.* A análise farmacogenética retrospectiva foi conduzida em todos os pacientes que tinham consentido

em prover amostras para a investigação farmacogenética. A meta principal foi identificar as associações entre variação genética e variações na eficácia de tratamento com aliskiren, acessado principalmente por MSDBP e em segundo lugar por MSSBP e a relação de responder.

- 5 A abordagem do gene candidato foi usada para selecionar 48 polimorfismos em 12 genes a partir do RAS ou previamente associados com a regulação da pressão arterial (tabela 4). Todas as amostras disponíveis foram genotipadas para cada SNP. Os estudos de associação foram a seguir realizados como descrito no exemplo I.

Tabela 4

Genes candidato selecionados para a análise farmacogenética

<u>Símbolo do Gene</u>	<u>Nome do Gene</u>
RENBP	Proteína de ligação renina
REN	renina
ACE	enzima de conversão de angiotensina I (peptidil-dipeptidase A) 1
ACE2	enzima de conversão de angiotensina I (peptidil-dipeptidase A) 2
AGT	angiotensinogênio
AGTR1	Receptor de angiotensina II, tipo 1
AGTR2	Receptor de angiotensina II, tipo 2
ABCC2/MRP2	Cassete de ligação ATP, subfamília C (CFTR/MRP), membro 2
AGTRAP	Proteína associada ao receptor de angiotensina II
CYP11B2	citocromo P450, família 11, subfamília B, polipeptídeo 2, aldosterona sintase
TGFB1	Fator de crescimento da transformação, beta 1
NOS3/eNOS	Óxido nítrico sintase 3 (célula endotelial)

- 10 *Amostras.* Os pacientes que participam no estudo clínico A2201 (vide, EXEMPLO I) e no estudo clínico A2203 foram solicitados fornecer um consentimento separado para a participação na análise farmacogenética. As amostras de sangue de todos os pacientes que consentiram foram coletadas nos sítios de estudo individuais e a seguir expedidas para Covance (Indianapolis, IN). O DNA genômico de cada paciente foi extraído do sangue por
- 15 Covance usando o PUREGENE® DNA Isolation Kit (D-50K) (Gentra, Minne-

apolis, MN) e expedido para NIBR para genotipificação. Ultimamente, 511 pacientes do estudo clínico no exemplo I (A2201) foram genotipificados com relações aproximadamente iguais de cada subdivisão do tratamento. Seiscentos e oitenta e quatro pacientes de A2203 foram genotipificados com relação de 3:1 de números de paciente em subdivisões da monoterapia com placebo e aliskiren para outras subdivisões do tratamento.

A variável de eficácia principal foi a mudança de MSDBP (redução em MSDBP a partir da linha de base no ponto final). As variáveis de eficácia secundária são a mudança de MSSBP (redução em MSSBP a partir da linha de base na ponto final), relação de responder, redução na atividade de renina de plasma (PRA) e aumento na renina de plasma ativo (AREN) a partir da linha de base.

*Genotipificação.* Ensaios de SNP foram projetados usando informação da base de dados de dbSNP público e da base de dados de Celera/ABI proprietária. Os conjuntos de sonda resultantes para o ensaio de genotipificação foram gerados para ABI's Assays-by-Design® platform. Livak KJ *et al.*, *Nat. Genet.* 9: 341-2 (1995). A genotipificação foi realizada em 10 ng de DNA genômico de acordo com as instruções do fabricante.

*Polimorfismos genotipificados.* A lista de polimorfismos genotipificados neste estudo, incluindo código do local, gene, referência e efeito da base de dados, é dada na tabela 5.

Tabela 5

Polimorfismos Genotipificados

<u>pg local id</u>	<u>gene</u>	<u>rs número</u>	<u>Descrição</u>
5284	ABCC2	hCV11305436	intrônico
4786	ABCC2	rs2273697	A>G I417V
4783	ABCC2	rs2756104	intrônico
4784	ABCC2	rs2756109	intrônico
4785	ABCC2	rs3740066	T>C I1324I
4782	ABCC2	rs717620	não traduzido
4797	ABCC2	rs8187710	A>G Y1515C
5286	ACE	hCV1247681	intrônico

<u>pg local id</u>	<u>gene</u>	<u>rs número</u>	<u>Descrição</u>
4766	ACE	rs4293	intrônico
4769	ACE	rs4317	C>T P32S
4767	ACE	rs4329	intrônico
4768	ACE	rs4362	C>T F1129F
400	ACE	rs4364	A>C S712R
1345	ACE		ins/del
4746	ACE2	rs2285666	intrônico
1669	ACE2	rs879922	intrônico
4773	AGT	rs1926723	intrônico
1667	AGT	rs4762	T>C M207T
2	AGT	rs699	C>T T268M
4772	AGT	rs943580	genômico
4796	AGTR1	rs2638362	intrônico
4780	AGTR1	rs3772616	intrônico
411	AGTR1	rs5182	C>T L191L
5287	AGTR2	hCV1841569	
1445	AGTR2	rs1403543	não traduzido
186	AGTR2	rs5193	não traduzido
4795	AGTR2-LD	rs4497127	genômico
5288	AGTRAP	hCV516817	intrônico
4787	AGTRAP	rs4073574	genômico
4789	CYP11B2	rs4539	G>A R173K
575	CYP11B2	rs4544	C>T T339I
4788	CYP11B2	rs4545	A>G S435G
3541	CYP11B2	rs6431	intrônico
4792	NOS3	rs1007311	intrônico
482	NOS3	rs1799983	G>T E298D
4791	NOS3	rs1800779	genômico
4464	NOS3	rs1800780	intrônico
4793	NOS3	rs891512	intrônico
5292	REN	rs11571092	intrônico

<u>pg. local id</u>	<u>gene</u>	<u>rs número</u>	<u>Descrição</u>
1513	REN	rs1464816	intrônico
4771	REN	rs3730103	intrônico
4794	REN	rs6704321	C>G P403A
4770	RENBp	rs2269371	G>A G274D
2407	RENBp	rs2269372	intrônico
1676	RENBp	rs762656	genômico
5285	TGFB1	hCV11707868	intrônico
4790	TGFB1	rs2241717	intrônico
4798	TGFB1	rs8105161	intrônico

*Análise Estatística.* Os estudos de associação de genótipo-fenótipo e as análises relacionadas foram realizados em SAS (Cary, North Carolina) usando Analista.

Os testes de associação usaram genótipos categóricos como a variável independente, com nenhuma suposição sobre a dominância, e as várias variáveis de eficácia como variáveis dependentes. Os testes de variáveis dependentes contínuas usaram uma análise ANCOVA, e a regressão logística foi usada para variáveis dependentes categóricas. Note que nenhum dos resultados tem sido ajustado para testagem de hipóteses múltiplas. Um limiar de  $p < 0,05$  foi usado para definir associações sugestivas. As co-variáveis na análise de associação de genótipo-fenótipo foram: (1) nível da dose de tratamento; (2) região de estudo codificada como STU1A em A2201 (vide exemplo I) ou REGIÃO em A2203; (3) medição da linha de base de MSDBP e MSSBP; e (4) raça. A análise foi realizada em todas as amostras a partir das três subdivisões de aliskiren primeiro. Quando associações sugestivas foram vistas, a mesma análise foi feita nas subdivisões irbesartan e placebo.



Tabela 6

Características Demográficas e de linha de base de MSDBP de pacientes genotipificados (média  $\pm$  SE)

<u>A2201 (vide exemplo I)</u>				<u>A2203 (este exemplo)</u>			
<u>Tratamen-</u>	<u>N=</u>	<u>BMI</u>	<u>idade</u>	<u>Linha de Tratamento</u>	<u>N=</u>	<u>idade</u>	<u>Linha de</u>
<u>to.</u>				<u>base</u>			<u>base</u>
							<u>MSDBP</u>
Aliskiren 150 mg	99	31,01 $\pm$ 0,67	54,15 $\pm$ 1,30	98,76 $\pm$ 0,34	Aliskiren 75mg	102	54,73 $\pm$ 1,37
							98,69 $\pm$ 0,28
Aliskiren 300 mg	96	30,79 $\pm$ 0,58	55,93 $\pm$ 1,03	99,16 $\pm$ 0,36	Aliskiren 150mg	115	55,83 $\pm$ 1,18
							99,47 $\pm$ 0,35
Aliskiren 600 mg	101	30,53 $\pm$ 0,65	55,97 $\pm$ 1,08	98,90 $\pm$ 0,38	Aliskiren 300mg	102	57,09 $\pm$ 1,22
							99,26 $\pm$ 0,34
Irbesartan 150 mg	99	31,81 $\pm$ 0,72	56,66 $\pm$ 1,21	99,41 $\pm$ 0,40	Valsartan 80mg	39	58,08 $\pm$ 1,77
							99,30 $\pm$ 0,61
Placebo	103	30,65 $\pm$ 0,60	58,21 $\pm$ 1,15	98,89 $\pm$ 0,33	Valsartan 160mg	33	53,45 $\pm$ 2,15
							98,87 $\pm$ 0,69
					Valsartan 320mg	34	55,50 $\pm$ 1,65
							99,16 $\pm$ 0,57
					Aliskiren 75 mg e Valsartan 80mg	35	55,43 $\pm$ 1,95
							99,73 $\pm$ 0,64
					Aliskiren 150 mg e Valsartan 160mg	34	56,26 $\pm$ 1,94
							99,32 $\pm$ 0,61
					Aliskiren 300 mg e Valsartan 320mg	41	57,10 $\pm$ 1,86
							98,82 $\pm$ 0,46
					Valsartan 160mg e HCTZ 12,5 mg	41	55,41 $\pm$ 1,93
							98,83 $\pm$ 0,55
					Placebo	108	55,80 $\pm$ 1,24
							98,86 $\pm$ 0,29

ACE. SNP 4769 foi genotipificado nos pacientes junto com outros seis polimorfismos nesta enzima crítica no RAS. A associação significativa foi vista entre SNP 4769 e a variável de eficácia principal, redução da

linha de base MSDBP ( $p=0,023$ ), e com a variável secundária, relação de responder ( $p=0,0048$ ). Para a outra variável secundária, a redução de MSSBP a partir da linha de base, não houve nenhuma associação significativa mas apenas a mesma tendência vista ( $p=0,14$ ).

- 5 Quando a análise ANCOVA foi repetida com o mesmo modelo para cada grupo de tratamento, a associação foi apenas detectada para os grupos tratados com aliskiren, mas não os grupos ibesartan ou placebo. Os efeitos específicos do aliskiren são mostrados na tabela 7. Nenhuma associação significativa foi verificada entre quaisquer SNPs e os parâmetros da
- 10 atividade de renina de plasma (PRA) e renina ativa (AREN).

Tabela 7

Efeito de variações de ACE e AGTR2 sobre MSDBP, MSSBP e relação de responder em grupos tratados com aliskiren em A2201 (\* denota significância,  $p<0,05$ )

	<u>SNP_4769</u>			<u>SNP_1445</u>			<u>SNP_4795</u>		
	TT	CT	CC	AA	AG	GG	GG	GA	AA
n	278	14	0	106	69	118	106	72	115
Redução de LSME- AN de MSDBP (mm de Hg)	-11,4	-5,6	NA	-11,0	-13,3	-9,4	-10,8	-13,4	-9,2
p	0,023*			0,0071*			0,0026*		
Redução LSMEAN de MSSBP (mm de Hg)	-11,7	-5,9	NA	-11,2	-13,8	-9,8	-10,8	-14,2	-9,5
p	0,14			0,13			0,046*		
Relação de Res- ponder	70%	14%	NA	75%	71%	58%	75%	74%	57%
p	0,0048*			0,17			0,060		

- 15 SNP\_4769 é um SNP de codificação que muda a sequência de prolina para serina no códon 32 na isoforma 2 e 3 da enzima ACE. O polimorfismo de ACE I/D (presença ou ausência de uma sequência repetida de 287 bp Alu em intron 16) tem sido associado com a regulação e a atividade

do nível de ACE e suas ramificações no RAS. Rigat B *et al.*, *J. Clin. Invest.* 86(4):1343-6 (1990). Neste exercício, foi testada a ACE I/D e não observou-se nenhuma associação com a resposta de aliskiren. SNP\_4769 é localizada no 12º intron da codificação do gene de ACE para isoform somático, e é localizada no primeiro exon da codificação do gene para o segundo e terceiro isoforms. ACE I/D é localizada no 16º intron, que é o mesmo bloco de desequilíbrio de ligação que de SNP\_4769 nas populações caucaseanas, africanas americanas, e chinesas caracterizadas (SNPbrowser, Applied Biosystems, Foster City, California).

10 *AGTR2*. O receptor de angiotensina II do tipo II tem sido mostrado para inibir a atividade de ACE e atenuar as ações mediadas do receptor do tipo I, dessa maneira causando vasodilatação. Ichiki T *et al.*, *Nature* 377(6551):748-50 (1995); Hunley TE *et al.*, *Kidney Int.* 57(2):570-7 (2000).

15 Uma associação significativa foi vista entre SNPs 1445 e 4795 e a variável de eficácia primária, redução de MSDBP da linha de base ( $p=0,0071$  e  $0,0026$  respectivamente). O SNP 4795 também demonstrou associação significativa com a variável secundária, redução de MSSBP da linha de base ( $p=0,046$ ), mas não com o outro parâmetro secundário, taxa de responder. Nesse meio tempo, o SNP 1445 não mostrou associação significativa com os parâmetros secundários. Nenhuma associação significativa  
20 foi encontrada entre quaisquer SNPs e os parâmetros secundários PRA e AREN.

Quando a análise ANCOVA foi repetida com o mesmo modelo para cada grupo de tratamento, a associação só foi detectada nos grupos tratados com aliskiren, mas não nos grupos de placebo ou ibesartan. Os efeitos do genótipo em pacientes tratados com aliskiren são mostrados acima na tabela 7.

Quando tentando replicar as associações vistas com esses dois SNPs em A2203 e nos braços tratados com aliskiren, os resultados não replicaram ( $p > 0,05$ ). Nenhuma tendência de associação foi observada, também. No resumo dos resultados dos estudos clínicos preliminares, devido a uma resposta de placebo maior do que previamente visto (8,6 mmHg), dose-

resposta e magnitude de efeitos subtraídos de placebo para o tratamento de aliskiren foram inferiores ao esperado. Essa inconsistência poderia ter contribuído, pelo menos parcialmente, para a falta de replicação da associação de AGTR2.

5               Esses dois SNPs são, ambos, não-codificados. O SNP 1445 está em uma região não traduzida do gene AGTR2, e o SNP\_4795 é de uma região genômica com desequilíbrio de ligação com o gene AGTR2. Pelo menos em chinês, esses dois SNPs estão no mesmo bloco de desequilíbrio de ligação (SNPbrowser, Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

10               *Discussão.* Essa análise identificou polimorfismos em dois genes com associações significativas com variáveis de resultado clínico no estudo de A2201 (vide o EXEMPLO I). Uma variante no gene de ACE e dois SNPs no gene de AGTR2 mostraram associação significativa com o parâmetro primário MSDBP. A variante de ACE e uma das variants de AGTR2 também  
15 mostraram associação significativa com os parâmetros secundários MSSBP e a taxa de responder. A segunda variante de AGTR2 não mostrou associação significativa mas somente a mesma tendência para os parâmetros secundários. Esse efeito do genótipo só foi visto nos grupos tratados com aliskiren, mas não nos grupos com ibesartan ou placebo. Portanto, o efeito descrito  
20 crito acima sugere ser um efeito farmacogenético específico do aliskiren.

O efeito da variante ACE Pro32Ser é particularmente interessante, pois a diferença entre os genótipos TT e CT parece ser bastante drástica (redução de MSDBP 11,4 versus 5,6 mm Hg, redução de MSSBP 11,7 versus 5,9 mm Hg, e taxa de responder 70% versus 14%). Entretanto, nenhum  
25 genótipo homozigoto CC foi visto entre todos os pacientes. Isso torna a frequência de alelo detectada muito mais baixa do que a frequência de alelo reportada para SNP DB de 0,1, e o número total de paciente com o genótipo CT em um lado muito pequeno. Descobriu-se uma frequência de alelo C mais alta em negros do que em caucasianos (19/154 versus 2/790). Em  
30 A2203, todos os 4 pacientes com o resíduo de serina (alelo C) eram negros. Devido o número extremamente pequeno de paciente com alelo C, análise A2203 não pode ser conduzida com o mesmo modelo.

Os polimorfismos de ACE e sua influência sobre a concentração de plasma da enzima ACE e a pressão arterial foram observados principalmente em africanos e populações afro-americanas. Bouzekri N *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* 12(6):460-8 (2004); Cox R *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 11(23):2969-77 (2002); Zhu X *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 68(5):1139-48 (2001). A observação de frequência de alelo mais alta de SNP\_4769 no gene de ACE em pacientes negros a partir de dois estudos de SPP100 garante uma investigação adicional da influência funcional que esse polimorfismo pode ter sobre o nível ou atividade de ACE. Além disso, a mudança do aminoácido no códon 32 é especulada para estar no isoform da enzima de testículos.

Quando segregando resposta de aliskiren pelo genótipo, a taxa de resposta para o genótipo TT aumenta para aproximadamente 70%. A implicação é que esse resultado pode ajudar a posição do fármaco no mercado anti-hipertensivo abarrotado por se direcionar para a maioria da população em geral (cerca de 80% de acordo com a frequência de alelo SNP DB, pode até ser maior como visto nesse estudo) que teve o genótipo TT associado com a taxa de resposta melhor, como visto na figura 2. Pode prover também uma maneira de ajudar a recrutar responders potencialmente "melhores" para o aliskiren em estudos futuros.

Os dois SNPs no gene AGTR2 são muito semelhantes no desequilíbrio de ligação, pois a região de cromossomas ao redor desse local está amplamente em um bloco de desequilíbrio de ligação. A função de sinalização de Ang II através do receptor do tipo II tem sido menos estudada em comparação com do receptor do tipo I. Essa descoberta pode ainda sugerir envolvimento de AGTR2 na função de Ang II na regulação da pressão arterial a jusante para a inibição de renina.

Esses SNPs reportados não mostraram associação com as mensurações de linha de base de MSDBP e MSSBP. Isso sugere que o efeito genético é um efeito farmacogenético relacionado ao aliskiren.

#### Equivalentes

Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são a-

nunciados na descrição de acompanhamento acima. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes a esses descritos aqui possam ser usados na prática ou para testar a presente invenção, os métodos e materiais preferidos estão agora descritos. Outros aspectos, objetos e vantagens da invenção serão aparentes a partir da descrição e das reivindicações. Na especificação e nas reivindicações anexadas, as formas singulares incluem referentes no plural, a menos que o contexto claramente determine de outra maneira. A menos que de outra maneira definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente compreendido pela pessoa de conhecimento comum na técnica à qual essa invenção pertence. Todas as referências citadas aqui são incorporadas aqui por referência em sua inteireza e para todos os fins, na mesma extensão como se cada publicação, patente, ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada por referência em sua inteireza para todos os fins.

A presente invenção não deve ser limitada em termos das modalidades em particular descritas neste pedido, as quais pretendem ser simples ilustrações de aspectos individuais da invenção. Muitas modificações e variações desta invenção podem ser feitas sem se afastar de seu espírito e escopo, como ficará claro para aqueles versados na técnica. Funcionalmente métodos e aparelhos equivalentes, dentro do escopo da invenção, em adição àqueles enumerados aqui, serão aparentes para àqueles versados na técnica a partir das descrições anteriores. Tais modificações e variações pretendem estar dentro das reivindicações anexadas. A presente invenção deve ser limitada somente pelos termos das reivindicações anexadas, junto com o escopo todo de equivalentes ao quais tais reivindicações têm direito.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de aliskiren na fabricação de um medicamento para o tratamento de hipertensão em uma população de pacientes selecionada, em que a população de pacientes é selecionada na base de polimorfismos genéticos em genes biomarcadores presentes no paciente, em que os polimorfismos genéticos são indicativos da eficácia de aliskiren no tratamento de hipertensão.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que polimorfismos genéticos são selecionados a partir do grupo que consiste em SNP\_4769 no gene da enzima de conversão de angiotensina (ACE); SNP\_1445 no gene de receptor de angiotensina II, do tipo 2 (AGTR2); SNP\_4795 no gene de AGTR2; e combinações dos mesmos.

3. Método para determinar a sensibilidade de um indivíduo com hipertensão para o tratamento com um agente anti-hipertensivo, compreendendo as etapas de;

(a) obtenção, para duas cópias de genes presentes no indivíduo, a identidade dos pares de nucleotídeos em um ou mais locais genéticos polimórficos, em que os locais genéticos são selecionados a partir do grupo que consiste em gene de enzima de conversão de angiotensina (ACE), o gene receptor de angiotensina II, tipo 2 (AGTR2), e combinações dos mesmos; e

(b) designação do indivíduo para um grupo de responder "alto" se os pares de nucleotídeos nos locais polimórficos indicam que o indivíduo é sensível ao tratamento com o agente anti-hipertensivo.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que os polimorfismos genéticos são selecionados a partir do grupo que consiste em SNP\_4769 na enzima de conversão de angiotensina (ACE); SNP\_1445 no receptor de angiotensina II, do tipo 2 (AGTR2); SNP\_4795 no gene de AGTR2 gene; e combinações dos mesmos.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o agente anti-hipertensivo é aliskiren.

6. Método para tratar hipertensão em um indivíduo, que compre-

ende as etapas de:

(a) obtenção, para duas cópias de genes presentes no indivíduo, a identidade dos pares de nucleotídeos em um ou mais locais genéticos polimórficos, em que os locais genéticos são selecionados a partir do grupo que consiste em gene de enzima de conversão de angiotensina (ACE), o gene receptor de angiotensina II, tipo 2 (AGTR2), e combinações dos mesmos; e

(b) ou (i) administrar um agente anti-hipertensivo para o indivíduo se o par de nucleotídeos nos locais polimórficos indicam que o indivíduo é sensível ao tratamento com o agente anti-hipertensivo, ou (ii) administrar uma terapia alternativa para o indivíduo se o par de nucleotídeos nos locais polimórficos indica que o indivíduo não é sensível ao tratamento com um agente anti-hipertensivo.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que os polimorfismos genéticos são selecionados a partir do grupo que consiste em SNP\_4769 no gene de enzima de conversão de angiotensina (ACE); SNP\_1445 no gene do receptor de angiotensina II, tipo 2 (AGTR2); SNP\_4795 no gene de AGTR2; e combinações dos mesmos.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o agente anti-hipertensivo é aliskiren.

9. Método para redução da pressão arterial sistólica média em repouso (MSSBP) em um indivíduo, compreendendo as etapas de:

(a) obtenção, para as duas cópias de genes presentes no indivíduo, a identidade de um par de nucleotídeos em SNP\_4795 do gene de receptor de angiotensina II do tipo 2 (AGTR2); e

(b) ou (i) administrar um agente anti-hipertensivo para o indivíduo se o par de nucleotídeos em SNP\_4795 indica que o indivíduo é sensível ao tratamento com um agente anti-hipertensivo, ou (ii) administrar uma terapia alternativa para o indivíduo se o par de nucleotídeos em SNP\_4795 indica que o indivíduo não é sensível ao tratamento com um agente anti-hipertensivo.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o agente



anti-hipertensivo é aliskiren.

11. Método para redução da pressão arterial diastólica em um indivíduo, compreendendo as etapas de:

- 5 (a) obtenção, para as duas cópias de genes presentes no indivíduo tendo uma pressão arterial diastólica com necessidade de redução, a identidade dos pares de nucleotídeos em um ou mais locais genéticos polimórficos, em que os locais genéticos são selecionados a partir do grupo que consiste em gene de enzima de conversão de angiotensina (ACE), o receptor de angiotensina II do tipo 2 (AGTR2), e combinações dos mesmos; e
- 10 (b) ou (i) administrar um agente anti-hipertensivo para o indivíduo se a identidade dos pares de nucleotídeos em um ou mais locais genéticos polimórficos indicar que o indivíduo é sensível ao tratamento com um agente anti-hipertensivo, ou (ii) administrar uma terapia alternativa para o indivíduo se a identidade dos pares de nucleotídeos em um ou mais locais
- 15 genéticos polimórficos indicar que o indivíduo não é sensível ao tratamento com um agente anti-hipertensivo.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o agente anti-hipertensivo é aliskiren.

13. Uso de um produto de gene de um gene selecionado a partir
- 20 do grupo que consiste em gene de enzima de conversão de angiotensina (ACE) e gene de receptor de angiotensina II do tipo 2 (AGTR2) como um alvo para a atividade do fármaco, em que o uso compreende as etapas de:

- (a) contactar o fármaco com o primeiro produto de gene codificado por um polinucleotídeo que tem um par de nucleotídeos em um local
- 25 polimórfico na região de um gene selecionado indicando alta sensibilidade ao tratamento com aliskiren para hipertensão;

(b) identificar a atividade do fármaco sobre o dito primeiro produto de gene;

- (c) contactar o fármaco com um segundo produto de gene codificado por um polinucleotídeo que tem um par de nucleotídeos em um local
- 30 polimórfico na região do gene selecionado indicando baixa sensibilidade ao tratamento com aliskiren para hipertensão;

(d) identificar a atividade do fármaco sobre o dito segundo produto de gene;

(e) identificar as similaridade e diferenças entre a atividade identificada na etapa (b) e a atividade identificada na etapa (d).

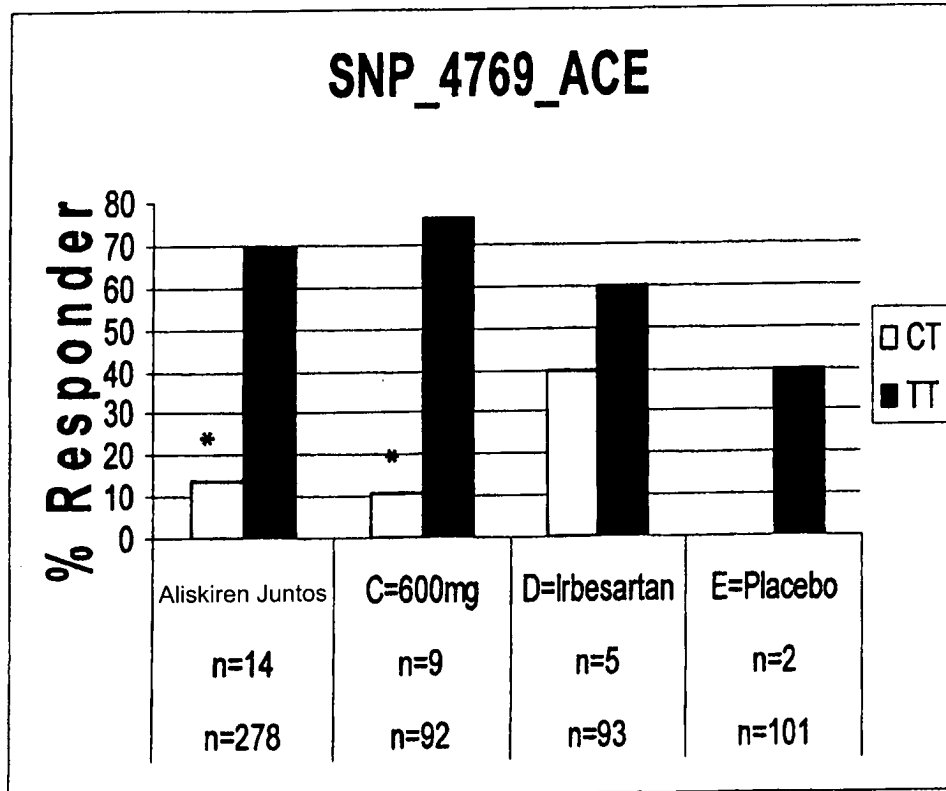


FIG. 1

## RESUMO

Patente de Invenção: "**BIOMARCADORES PARA A EFICÁCIA DE ALISKIREN COMO UM AGENTE HIPERTENSIVO**".

A presente invenção refere-se a uma análise farmacogenética retrospectiva que foi conduzida em uma tentativa de avaliar a associação potencial entre uma variação genética e o resultado de um estudo clínico de eficácia de aliskiren como um agente anti-hipertensivo. Quarenta e cinco polimorfismos foram examinados em doze genes do sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAS) ou previamente implicados na regulação da pressão arterial. Associações significativas foram vistas entre um polimorfismo no gene da enzima de conversão de angiotensina (ACE), dois polimorfismos no gene do receptor de angiotensina II do tipo 2 (AGTR2), e parâmetros clínicos da redução de pressão arterial sistólica e diastólica média em repouso. Estes efeitos não foram encontrados com tratamento com irbesartan e placebo, mas ao invés disso foram específicos ao tratamento com aliskiren.