



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0811309-2 B1**



**(22) Data do Depósito:** 09/05/2008

**(45) Data de Concessão:** 03/03/2022

---

**(54) Título:** MÉTODOS IN VITRO PARA AVALIAR UMA RESPONSABILIDADE DO GENE APO(A) EM UMA AMOSTRA DE ÁCIDO NUCLEICO DE UM INDIVÍDUO HUMANO AO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACETILSALICÍLICO PARA REDUZIR O RISCO DE UM EVENTO CARDIOVASCULAR FUTURO

**(51) Int.Cl.:** C12Q 1/68.

**(30) Prioridade Unionista:** 09/05/2007 US 60/916.858.

**(73) Titular(es):** THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.; CELERA CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** PAUL RIDKER; DANIEL CHASMAN; DOV SHIFFMAN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2008005986 de 09/05/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/140776 de 20/11/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 09/11/2009

**(57) Resumo:** POLIMORFISMO NA RECEPTIVIDADE PREVISTA DO GENE APO(A) AO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACETILSALICÍLICO A presente invenção refere-se a polimorfismos de nucleotídeo nos genes Apo (a) de humanos e ao uso de polimorfismos de nucleotídeo de Apo (a) na identificação de se um humano irá responder ou não ao tratamento com ácido acetilsalicílico.

“MÉTODOS *IN VITRO* PARA AVALIAR UMA RESPONSABILIDADE DO GENE APO(A) EM UMA AMOSTRA DE ÁCIDO NUCLEICO DE UM INDIVÍDUO HUMANO AO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACETILSALICÍLICO PARA REDUZIR O RISCO DE UM EVENTO CARDIOVASCULAR FUTURO”

Campo da invenção

[0001] A presente invenção refere-se a métodos para analisar as variações nucleotídicas no gene de apolipoproteína (a) (Apo(a)) para avaliar uma resposta do indivíduo humano à terapia com ácido acetilsalicílico.

Fundamento

[0002] A Lipoproteína (a) (Lp(a)) é um complexo de plasma que consiste em uma única molécula covalente de apolipoproteína (a) (Apo(a)) ligada através de uma ligação de dissulfeto a uma única molécula de apolipoproteína B-100 juntamente com lipídio rico em colesterol (Marcovina et al. in Handbook of Lipoproteína testing Rifai et al. Eds.: AACC Press, Washington, D.C., 2000; p. 819). Enquanto as funções biológicas de Lp(a) na fisiologia normal permanecem incertas, níveis altos de Lp(a) têm sido associados ao aumento de risco cardiovascular e eventos cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, particularmente quando LDL-C for também elevado (Berglund et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 2219 (2004); Hobbs et al., Curr Opin Lipidol 10, 225 (1999); Danesh et al., Circulation 102, 1082 (2000); Ridker et al., JAMA 297, 611 (2007); Danik et al., JAMA 296, 1363 (2006)).

[0003] O locus de apolipoproteína (a) está dentre os mais polimórficos no genoma humano. A variação genética de Apo(a) tem sido associada à ampla faixa de níveis de Lp(a) e conta amplamente para a hereditariedade de Lp(a) (Broeckel et al., Nat Genet 30, 210 (2002); Boerwinkle et al., J Clin Invest 90, 52 (1992); Mooser et al., Am J Hum Genet 61, 402 (1997); Schmidt et al., Eur J Hum Genet 14 190 (2006)). Recentemente, muitos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene Apo(a)

foram identificados e foram associados a distúrbios cardiovasculares tais como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral e/ou reação ao fármaco tal como reação à estatina (Ver Publicação do Pedido de Patente U.S. US2005/0272054A1).

[0004] Indivíduos com risco elevado de eventos cardiovasculares futuros são frequentemente prescritos com ácido acetilsalicílico (aspirina) para reduzir o risco de um evento cardiovascular. No entanto, o ácido acetilsalicílico não é eficaz em todos os indivíduos e o uso de ácido acetilsalicílico (aspirina) como prevenção primária contra eventos cardiovasculares tem sido controverso, particularmente em mulheres, para quem tiveram poucos dados (Ridker et al., N Engl J Med 352, 1293; 2005). Desse modo, existe uma necessidade contínua de aperfeiçoar o projeto e terapia de seleção do agente farmacêutico. Em relação a isto, os SNPs podem ser utilizados para identificar pacientes mais adequados ao tratamento com agentes farmacêuticos específicos tais como ácido acetilsalicílico e/ou outros antiplaquetários e/ou agentes antitrombóticos (isto é frequentemente denominado "farmacogenéticos"). De modo similar, os SNPs podem ser utilizados para excluir pacientes de certos tratamentos devido à alta probabilidade do paciente em desenvolver efeitos laterais tóxicos ou sua probabilidade de não responder ao tratamento. Fazendo isso, tais SNPs poderiam ser úteis na definição da relação benefício para risco de uma dada intervenção para cada indivíduo. Os farmacogenéticos podem também ser utilizados na pesquisa farmacêutica para assistir o desenvolvimento do fármaco e o processo de seleção. (Linder et al., Clinical Chemistry, 43, 254 (1997); Marshall, Nature Biotechnology, 15, 1249 (1997); International Patent Application WO 97/40462, Spectra Biomedical; e Schafer et al., Nature Biotechnology, 16, 3(1998)).

#### Sumário da Invenção

[0005] A presente invenção refere-se, em parte, a métodos para avaliar uma reação do indivíduo humano ao tratamento com ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. A presente invenção é baseada, em parte,

na descoberta de que os novos polimorfismos de nucleotídeo no gene Apo(a) permitem uma inferência a ser desenhada como se um indivíduo humano irá responder ou não ao tratamento com ácido acetilsalicílico, a uma dose específica de ácido acetilsalicílico, ou a outro agente antiplaquetário ou antitrombótico. A invenção permite identificar indivíduos que irão reagir e indivíduos que não irão reagir ao tratamento com ácido acetilsalicílico antes do início da terapia. A invenção também permite selecionar dentre os agentes antiplaquetários e antitrombóticos os agentes mais prováveis a oferecer o mais alto benefício de baixo risco de um evento cardiovascular para um indivíduo específico. Os polimorfismos descritos são também úteis como meta para o projeto de reagentes diagnósticos e para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para uso no diagnóstico e tratamento de eventos cardiovasculares e patologias relacionadas.

[0006] De acordo com um aspecto da invenção, um método é provido para avaliar uma responsividade do indivíduo humano ao tratamento com ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. O método envolve determinar a identidade de um polimorfismo de nucleotídeo único na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene da alipoproteína (a) (Apo(a)) do indivíduo. Em algumas modalidades importantes, a presença de um polimorfismo caracterizado por citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 indica responsividade ao tratamento com ácido acetilsalicílico. Em outras modalidades importantes, a presença de um polimorfismo caracterizado por timina ou adenina na posição do cromossomo 6:160880877 indica nenhuma responsividade ao tratamento com ácido acetilsalicílico. Qualquer de uma variedade de métodos de detecção pode ser empregada, como será bem-conhecido àqueles versados na técnica. Métodos comuns incluem contatar um ácido nucléico obtido a partir do indivíduo com uma sonda de ácido nucléico ou ordenando um ácido nucléico obtido a partir do indivíduo.

Exemplos de tais métodos incluem, mas não estão limitados a hibridização de sonda alelo específico, extensão do iniciador de alelo específico, amplificação de alelo específico, digestão de 5' nuclease, ensaio de sinalizador molecular, ensaio de ligação oligonucleotídica, análise de tamanho, e polimorfismo de conformação de filamento único. Em algumas modalidades importantes, a identidade do polimorfismo é determinada ordenando um ácido nucléico obtido a partir do indivíduo.

[0007] De acordo com outro aspecto da invenção, um ensaio é provido. O ensaio envolve contatar um agente com uma proteína Apo(a) isolada codificada por um gene Apo(a) possuindo citosina ou guanina nucleotídica no cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI), avaliando a ligação do agente à proteína Apo(a) isolada ou à Lipoproteína (a) (Lp(a)), e comparar a ligação a um controle. Em algumas modalidades, o controle envolve uma medição da ligação de um ácido acetilsalicílico à proteína Apo(a) ou a Lp(a), ou às plaquetas ou uma medida da interação de ácido acetilsalicílico com as plaquetas. De acordo com outro aspecto da invenção, um ensaio é provido. O ensaio envolve contatar um agente com uma proteína Apo (a) isolada codificada por um gene Apo(a) possuindo timina ou adenina nucleotídica no cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI), avaliando a ligação do agente à proteína Apo(a) isolada, e comparando a ligação a um controle. Em algumas modalidades, o controle envolve uma medida da ligação de um ácido acetilsalicílico à proteína Apo(a) isolada ou a Lp(a), ou às plaquetas ou a uma medida da interação do ácido acetilsalicílico com as plaquetas.

[0008] De acordo com outro aspecto da invenção, um método de tratamento é provido. O método envolve selecionar um indivíduo humano com base em que o indivíduo humano possua um polimorfismo de Apo(a) caracterizado por citosina ou guanina no cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI

construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) e administrar ao indivíduo ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro devido ao indivíduo possuir o polimorfismo. Em algumas modalidades, o indivíduo também possui um nível elevado de Lp(a) no sangue.

[0009] De acordo com outro aspecto da invenção, um método de tratamento é provido. O método envolve selecionar um indivíduo humano com base em que o indivíduo humano possua um polimorfismo de Apo(a) caracterizado por timina ou adenina no cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) e administrar ao indivíduo um outro agente antitrombótico que não o ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro devido ao indivíduo possuir o polimorfismo. Em algumas modalidades, o indivíduo também possui um nível elevado de Lp(a) no sangue.

[00010] O agente antitrombótico pode ser uma tienopiridina ou um derivado de tienopiridina. Exemplos de tienopiridina ou um derivado de tienopiridina incluem, mas não estão limitados a clopidogrel, bissulfato clopidogrel, ticlopidina, prasugrel (CS - 747, ou LY 640315), SR 25989, e PCR 4099. Os agentes antitrombóticos também incluem, mas não estão limitados a sódio de enoxaparin, ximelagatran, abciximab, tirofiban. Exemplos de outros agentes antitrombóticos também incluem ativador do plasminogênio (por exemplo, Activase, Alteplase) (catalisa a conversão de plasminogênio inativo para plasmina. Isto pode ocorrer através de interações de prekallikrein, kininogens, Fatores XII, XIIIa, pro-ativador de plasminogênio, e tecido ativador de plasminogênio TPA), Estreptoquinase, Urocinase, Anisoilato Complexo Ativador de Estreptoquinase - Plasminogênio, Pró-Urocinase, (Pró- UK), rTPA (alteplase ou activase; r significa recombinante), rPro-UK, Abbocinase, Eminase, Esreptase, Anagrelide, Cloridrato de Anagrelide, Bivalirudin, Sódio de Dalteparin, sódio de Danaparoid, Cloridrato de Dazoxiben, Sulfato de Efegatran, Sódio de Enoxaparin, Ifetroban, Sódio de Ifetroban, Tinzaparin sódio, retaplase, Trifenagrel,

Warfarin, Dextranas, ácido aminocapróico (Amicar), e ácido tranexâmico (Amstat), Sulfinpirazona, Dipiridamol, Clofibrato, Piridinol Carbamato, PGE, Glucagon, fármacos de Antiserotonin, Cafeína, Theophyllin Pentoxifyllin, e Ticlopidina. Os agentes antitrombóticos também incluem aqueles que especificamente se ligam aos receptores de plaquetas incluindo, mas não limitados aos receptores PAR-I e PAR-2, bem como receptores de plaquetas para trombina, e os receptores de plaqueta ADP tais como P2Y<sub>12</sub>.

[00011] De acordo com outro aspecto da invenção, um método é provido para avaliar uma responsividade do indivíduo humano ao tratamento com ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. O método envolve detectar a presença ou ausência de um marcador genético ligado ou em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene da apolipoproteína (a) do indivíduo humano (Apo(a)). O marcador genético pode ser um alelo, um SNP, um polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), um DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD), um polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP), ou um uma sequência simples repetida (SSR).

[00012] Em algumas modalidades, o marcador genético é um SNP na posição do cromossomo 6:160849894 (NCBI construção 128; rs9457931 dbSNP@NCBI). Em algumas modalidades, o marcador genético é um SNP na posição do cromossomo 6:160830272 (NCBI construção 128; rs9457927 dbSNP@NCBI). Em algumas modalidades, a ligação está entre 16, 17, ou 18 repetições de domínio tipo 2 de Kringle (Kr) IV.

[00013] Em algumas modalidades, a presença de um polimorfismo caracterizado por citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 indica resposta ao ácido acetilsalicílico. Em outras modalidades importantes, a presença de

um polimorfismo caracterizado por timina ou adenina na posição do cromossomo 6:160880877 indica nenhuma resposta ao ácido acetilsalicílico. Em algumas modalidades, o método ainda envolve determinar um nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) em uma amostra de sangue proveniente do indivíduo.

[00014] De acordo com ainda outro aspecto da invenção, um método de tratamento é provido. O método envolve selecionar um indivíduo humano com base em que o indivíduo humano possua um marcador genético ligado ou em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo de Apo (a) caracterizado por citosina ou guanina no cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) e administrar ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro devido ao indivíduo possuir o polimorfismo.

[00015] O marcador genético pode ser um alelo, um SNP, um polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), um DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD), um polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP), ou um marcador microssatélite (SSR). Em algumas modalidades, o indivíduo humano também possui um nível elevado de Lipoproteína (a) (Lp(a)) no sangue.

[00016] Em algumas modalidades, o marcador genético é um SNP na posição do cromossomo 6:160849894 (NCBI construção 128; rs9457931 dbSNP@NCBI). Em algumas modalidades, o marcador genético é um SNP na posição do cromossomo 6:160830272 (NCBI construção 128; rs9457927 dbSNP@NCBI). Em algumas modalidades, a ligação está entre 16, 17, ou 18 repetições de domínio tipo 2 Kringle (Kr) IV.

[00017] De acordo com ainda outro aspecto da invenção, um método de tratamento é provido. O método envolve selecionar um indivíduo humano com base em que o indivíduo humano possua um marcador genético ou em desequilíbrio de ligação ou com um polimorfismo de Apo(a) caracterizado por timina ou adenina no cromossomo 6: 160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1;

rs3798220 dbSNP @ NCBI), e administrar ao indivíduo um outro agente antitrombótico que não o ácido acético para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro devido ao indivíduo ter o polimorfismo. Em algumas modalidades, o indivíduo humano possui um elevado nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) no sangue.

[00018] O marcador genético pode ser um alelo, um SNP, um polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), um DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD), um polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP), ou um marcador microssatélite (SSR). Em algumas modalidades, o indivíduo humano também possui um elevado nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) no sangue.

[00019] De acordo com ainda outro aspecto da invenção, um método é provido para avaliar um risco do indivíduo humano de um evento cardiovascular futuro. O método envolve determinar a identidade de um polimorfismo de nucleotídeo único na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene Apo(a) do indivíduo humano, e determinar um nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) em uma amostra de sangue proveniente do indivíduo humano. Em algumas modalidades, a presença de um polimorfismo caracterizado por citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene Apo(a) do indivíduo humano e a presença de nível elevado de Lp(a) na amostra de sangue proveniente do indivíduo indica que o indivíduo está em um risco elevado de um evento cardiovascular futuro.

[00020] As modalidades a seguir se aplicam igualmente aos vários aspectos da invenção apresentados aqui a menos que indicados de outro modo aqui.

[00021] O evento cardiovascular pode ser infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, síndrome coronariana aguda, isquemia do miocárdio, angina de peito estável crônica, angina de peito instável, morte cardiovascular, reestenose

coronária, reestenose do stent coronário, re-trombose do stent coronário, revascularização, angioplastia, ataque isquêmico transitório, embolismo pulmonar, oclusão vascular, ou trombose venosa. Em algumas modalidades, o método ainda envolve determinar um nível de Lp(a) em uma amostra de sangue proveniente do indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo possui um nível elevado de Lp(a) no sangue. O nível de Lp(a) pode ser cerca de 10 mg/dl ou mais alto, cerca de 15 mg/dl ou mais alto, cerca de 20 mg/dl ou mais alto, cerca de 25 mg/dl ou mais alto, cerca de 30 mg/dl ou mais alto, cerca de 35 mg/dl ou mais alto, cerca de 40 mg/dl ou mais alto, cerca de 45 mg/dl ou mais alto, cerca de 50 mg/dl ou mais alto na amostra de sangue proveniente do indivíduo. Qualquer de uma variedade de método pode ser empregada para determinar o nível de Lp(a). Tais métodos são conhecidos daqueles versados na técnica. Um exemplo de um método para determinar o nível de Lp(a) está descrito por Danik et al., JAMA 296, 1363 (2006). Estes e outros aspectos da invenção estão descritos em maiores detalhes abaixo.

#### Breve Descrição das Figuras

[00022] A Figura 1 é um conjunto de gráficos mostrando a relação entre Lp(a) e o genótipo rs3798220.

[00023] A) Níveis Lp(a) dentre participantes de estudo de fêmeas Caucasianas a partir de WHS (média = 10,3mg/dL), B) Níveis Lp(a) como em A) dentre os três genótipos de rs3798220. As amplitudes interquartis (IQR) são médias para os três genótipos estão indicados pelas caixas e suas linhas médias. Os suíças abrangem a amplitude dos valores de Lp(a) até 1,5 vezes o IQR proveniente da média, e valores extremos de Lp(a) além dos suíças serem indicados por círculos. C) Níveis Lp(a) para mulheres Caucasianas com genótipo heterozigoto (média = 79,3 mg/dL). Modelos para distribuição de Lp(a) em subpopulações com baixo Lp(a) e alto Lp(a) são indicados através de distribuições normal e log-normal ajustadas, respectivamente. D) Distribuição Lp(a) dentre machos Caucasianos provenientes de

PHS com genótipo heterozigoto para rs3798220 (media = 66,9 mg/dL, medido com um ensaio diferente que para as amostras provenientes do WHS, ver métodos).

[00024] A Figura 2 é um conjunto de gráficos mostrando a atenuação de risco de rs3798220 ou Lp(a) elevado através de terapia com aspirina. Estimativa de Kaplan-Meier da fração cumulativa de participantes de WHS Caucasianas com incidente de doença vascular. A) estratificada pelo genótipo rs3798220 e aspirina ou atribuição de placebo durante o ensaio de WHS para o ponto terminal de compósito de maior evento vascular, B) como em A), mas para o ponto terminal de infarto do miocárdio, C) como em A), mas para o ponto terminal de acidente vascular cerebral isquêmico, e D) dentre não-veículos do menor alelo de rs3798220 (genótipo TT) estratificado por níveis Lp(a) acima ou abaixo de 90<sup>th</sup> percentil (65,1 mg/dL) e aspirina ou atribuição de placebo para o ponto terminal do compósito de maior de maior evento vascular.

[00025] A Figura 3 é um conjunto de histogramas mostrando a distribuição de número KrlV2r dentre brancos hispânicos.

[00026] A Figura 4 é um plano mostrando a distribuição do nível Lp(a) de acordo com o número de KrlV2r's dentre os brancos não-Hispânicos.

[00027] A Figura 5 é um plano mostrando os números de KrlV2r's (isto é, alelos) com níveis significativamente diferentes de Lp(a) de acordo com o genótipo rs3798220 dentre os brancos não-Hispânicos.

#### Descrição Detalhada da Invenção

[00028] A invenção refere-se, em parte, aos SNPs no gene Apo(a) que estão associados à responsividade do indivíduo ao tratamento com ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. A invenção também se refere ao uso do polimorfismo no gene Apo(a) sozinho ou em combinação com o nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) para avaliação uma reação do indivíduo humano ao tratamento com ácido acetilsalicílico e aos métodos de tratamento baseados no mesmo. A invenção é também direcionada a identificar e designer novos agentes

antitrombóticos.

[00029] Como utilizado aqui, o termo "avaliar" ou "avaliando", quando utilizado em referência à responsividade do indivíduo ao tratamento com ácido acetilsalicílico, significa desenhar uma conclusão sobre a reação ao tratamento com ácido acetilsalicílico utilizando um processo de analisar a identidade de um nucleotídeo na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene Apo(a) do indivíduo humano em uma amostra de ácido nucléico do indivíduo, e comparar a ocorrência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) às relações conhecidas de ocorrência(s) nucleotídeo na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI). A ocorrência de nucleotídeo pode ser identificada diretamente examinando as moléculas de ácido nucléico, ou indiretamente examinando um polipeptídeo codificado pelo gene Apo(a).

[00030] A responsividade ao tratamento com ácido acetilsalicílico significa que, em um grupo de outra maneira estatisticamente similar de indivíduos, um indivíduo em tratamento com ácido acetilsalicílico que possua um polimorfismo caracterizado por citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene da apolipoproteína (a) (Apo(a)) do indivíduo humano é menos provável de ter um evento cardiovascular futuro que um indivíduo que não está em tratamento com ácido acetilsalicílico.

[00031] No contexto das sequências flanqueadoras, o alelo que está associado à responsividade de ácido acetilsalicílico na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) é, de acordo com a Universidade da Califórnia em Santa Cruz Genome Browser:

5'                    -                    GCTCCAAGAACAGCCTAGACACTTC                    C

ATTCCTGAACATGAGATTGAGGT-3' (SEQ ID NO:1)

3' - CGAGGTTCTTGTCTGGATCTGTGAAG G

TAAAGGACTTGTACTCTAAGCTCCA-5' (SEQ ID NO:2)

(A cadeia mais ("+") é a cadeia superior e a cadeia menos ("-") é a cadeia inferior)

[00032] O alelo que está associado à não-responsividade de ácido acetilsalicílico na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) é, de acordo com a Universidade da Califórnia em Santa Cruz Genome Browser:

5' - GCTCCAAGAACAGCCTAGACACTTC T

ATTCCTGAACATGAGATTGAGGT-3' (SEQ ID NO:3)

3' - CGAGGTTCTTGTCTGGATCTGTGAAG A

TAAAGGACTTGTACTCTAAGCTCCA-5' (SEQ ID NO:4)

(A cadeia mais ("+") é a cadeia superior e a cadeia menos ("-") é a cadeia inferior)

[00033] O gene Apo (a) SNP está descrito na Publicação do Pedido de Patente U.S. US2005272054 sob a designação rs3798220 hCV25930271. O gene Apo (a) SNP pode também ser encontrado no acoplamento da sequência do iniciador CGAATCTC ATGTTTCAGGAAAATA (SEQ ID NO:5) descrita na Publicação do Pedido de Patente U.S. US2005/0272054A1 cujos conteúdos inteiros estão aqui incorporados por referência.

[00034] O termo indivíduo humano inclui um ser humano que teve um evento cardiovascular, está suspeito de desenvolver um evento cardiovascular, ou um indivíduo assintomático que pode estar predisposto ou em risco de um evento cardiovascular futuro. Desse modo, em algumas modalidades, o indivíduo humano já teve um evento cardiovascular primário (primeiro), tal como, por exemplo, um infarto do miocárdio ou teve uma angioplastia. Um indivíduo humano que teve um evento

cardiovascular primário está em um risco elevado de um evento cardiovascular secundário (segundo). Em algumas modalidades, o indivíduo humano não teve um evento cardiovascular primário, mas está em um risco elevado de ter um evento cardiovascular devido ao humano ter um ou mais fatores de risco a ter um evento cardiovascular. Em algumas modalidades, o indivíduo já está em tratamento com uma terapia para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. A terapia pode ser quaisquer dos agentes terapêuticos referidos abaixo. Em ainda outras modalidades, o indivíduo teve um evento cardiovascular primário e tem um ou mais fatores de risco. Em algumas modalidades, o indivíduo humano está em terapia (por exemplo, terapia antilipêmica tal como terapia com estatina) para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. Em algumas modalidades, o indivíduo humano está no meio de uma síndrome coronária aguda e as decisões de tratamento estão sendo feitas tanto para gerenciar o evento cardiovascular imediato como para prevenir eventos recorrentes.

[00035] Exemplos de fatores de risco para um evento cardiovascular incluem: hiperlipidemia, obesidade, diabetes mellitus, hipertensão, pré-hipertensão, nível(is) elevado(s) de um marcador de inflamação sistêmica, idade, um histórico familiar de eventos cardiovasculares, e fumo de cigarros. O nível do risco de um evento cardiovascular depende da multidão e da gravidade da magnitude dos fatores de risco que o indivíduo humano possua. Os gráficos de risco e algoritmos de previsão estão disponíveis para avaliar o risco de eventos cardiovasculares em um indivíduo humano baseado na presença e gravidade de fatores de risco. Um tal exemplo é a pontuação de previsão de risco do Estudo do Coração de Framingham. O indivíduo humano está em um risco elevado de ter um evento cardiovascular se a pontuação de risco do Estudo do Coração de Framingham calculado em 10 anos do indivíduo for maior que 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, ou 20%.

[00036] Outro método para avaliar o risco de um evento cardiovascular em um indivíduo humano é uma pontuação de risco global que incorpora uma medida de um nível de um marcador de inflamação sistêmica, tal como CRP, na pontuação de previsão de risco do Estudo do Coração de Framingham. Outros métodos para avaliar o risco de um evento cardiovascular em um indivíduo humano incluem digitalização de cálcio coronário, imagem de ressonância magnética cardíaca, e/ou angiografia por ressonância magnética (Ridker et al., JAMA 297, 611, 2007).

[00037] Hiperlipidemia é hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia.

[00038] Indivíduos humanos hipercolesterolêmicos e indivíduos humanos hipertrigliceridêmicos estão em uma incidência aumentada de eventos cardiovasculares. Um indivíduo humano hipercolesterolêmico é um que ajusta o critério atual estabelecido para um indivíduo humano hipercolesterolêmico. Um indivíduo humano hipertrigliceridêmico é um que ajusta o critério atual estabelecido para um indivíduo hipertrigliceridêmico. Um indivíduo hipercolesterolêmico possui um nível LDL de  $> 160$  mg/dL, ou um nível LDL  $> 130$  mg/dL e pelo menos dois fatores de risco selecionados a partir do grupo consistindo em: gênero masculino, histórico familiar de doença coronária prematura, fumo de cigarro, hipertensão, baixo HDL ( $< 35$  mg/dL), diabetes mellitus, hiperinsulinemia, obesidade abdominal, alta Lipoproteína, e histórico pessoal de um evento cardiovascular. Um indivíduo humano hipertrigliceridêmico possui um nível de triglicerídeo (TG) de  $> 250$  mg/dL.

[00039] A hipertensão é definida como uma pressão sanguínea sistólica  $> 140$  mm Hg, e/ou uma pressão diastólica  $> 90$  mm Hg ou ambos. A pré-hipertensão é definida como a pressão sanguínea sistólica entre 115 e 140 mm Hg, e/ou uma pressão diastólica entre 80 e 90 mm Hg.

[00040] A obesidade é um estado de excesso de massa do tecido adiposo. Apesar de não ser uma medida direta de adiposidade, o método mais amplamente utilizado para medir a obesidade é o índice de massa corporal (BMI), que é igual ao

peso / altura <sup>2</sup> (em kg/m<sup>2</sup>) (Ver, por exemplo, Harrison's Principles of Experimental Medicine, 15th Edition, McGraw-Hill, Inc., N. Y.- hereinafter "Harrison's"). Com base nos dados de morbidade substancial, um BMI de 30 é mais comumente utilizado como um limite para obesidade em ambos os homens e mulheres. Um BMI entre 25 e 30 deveria ser visto como medicamente significante e digno de intervenção terapêutica, especialmente na presença de fatores de risco que são influenciados por adiposidade, tal como hipertensão e intolerância à glicose. Embora frequentemente visto como equivalente ao peso corporal elevado, isto não necessita ser o caso. Indivíduos magros, mas muito musculares podem estar acima do peso por padrões arbitrários sem ter aumentado a adiposidade. Outra aproximação para quantificar a obesidade inclui antropometria (espessura de prega cutânea), desitometria (pesagem hidrostática), tomografia computadorizada (CT) ou imagem por ressonância magnética (MRI), e/ou impedância elétrica.

[00041] A diabetes mellitus é estabilizada em um indivíduo humano com um nível de glicose de jejum de 125 mg/dL ou mais.

[00042] Um nível elevado de um marcador de inflamação sistêmica é um nível que está acima da media para uma população de indivíduos humanos saudáveis (isto é, indivíduos humanos que não possuem sinais e sintomas de doenças). Quando o marcador de inflamação sistêmica for CRP, um nível de CRP de  $\geq 1$  é considerado um nível elevado.

[00043] Terapias para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro incluem, mas não está limitado a dieta e/ou exercício e/ou terapias com: agentes antilipêmicos, agentes antiinflamatórios, agentes antitrombóticos, agentes fibrinolíticos, agentes antiplaquetários, inibidores diretos de trombina, inibidores de receptor de glicoproteína IIb/IIIa, agentes que se ligam às moléculas de adesão celular e inibem a capacidade de células brancas do sangue se unirem a tais moléculas (por exemplo, anticorpos da molécula de adesão anti-celular), bloqueadores alfa-

adrenérgico, bloqueadores beta-adrenérgico, inibidores ciclooxigenase-2, inibidor do sistema da angiotensina, antiarrítmico, bloqueadores de canal de cálcio, diuréticos, agentes inotrópicos, vasodilatadores, vasopressores, tiazolidinadionas, bloqueadores do receptor cannabinoid-1 e/ou quaisquer combinações dos mesmos.

[00044] Agentes antilipêmicos são agentes que reduzem o colesterol total, reduzem o LDLC, reduzem triglicerídeos, e/ou aumentam HDLC. Agentes antilipêmicos incluem agentes antilipêmicos de estatina e não-estatina, e/ou combinações dos mesmos. As estatinas são uma classe de medicamentos que foram mostrados para serem eficazes em baixar os níveis totais de colesterol, LDLC e triglicerídeos em humanos. As estatinas agem na etapa de síntese do colesterol. Reduzindo a quantidade de colesterol sintetizado pela célula, através da inibição do gene redutase HMG-CoA, as estatinas iniciam um ciclo de eventos que culminam no aumento de retenção de LDLC pelas células do fígado. Como a retenção de LDLC é aumentada, os níveis totais de colesterol e LDLC no sangue diminuem. Os níveis menores de sangue de ambos os fatores estão associados ao risco menor de aterosclerose, e doença do coração, e as estatinas são amplamente utilizadas para reduzir a morbidade e a mortalidade aterosclerótica.

[00045] Exemplos de estatinas incluem, mas não estão limitados a, sinvastatina (Zocor), lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravachol), fluvastatina (Lescol), atorvastatina (Lipitor), cerivastatina (Baycol), rosuvastatina (Crestor), pitivastatina e outros numerosos.

[00046] Agentes antilipêmicos de não-estatina incluem, mas não estão limitados aos derivados do ácido fibríco (fibrates), resinas ou sequestrantes de ácido de bile, agentes de ácido nicotínico, inibidores de absorção de colesterol, acil-coenzima A: inibidores de colesterol acil transferase (ACAT), inibidores de proteína de transporte do éster de colesterol (CETP), antagonistas do receptor LDL, antagonistas do farnesoid X receptor (FXR), ativadores da proteína de ativação de clivagem da

proteína de ligação reguladora de esterol (SCAP), inibidores da proteína microssômica de transporte de triglicerídeo (MTP), inibidores da sintase de escaleno, e antagonista do receptor ativado de proliferação de peroxissomas (PPAR).

[00047] Exemplos de derivados de ácido fibríco incluem, mas não estão limitados a gemfibrozil (Lopid), fenofibrato (Tricor), clofibrato (Atromid) e bezafibrato.

[00048] Exemplos de sequestrantes ou resinas de ácido de bile incluem, mas não estão limitados a colesvelam (WelChol), colestiramina (Questran ou Prevalite) e colestipol (Colestid), DMD-504, GT - 102279, HBS - 107 e S - 8921.

[00049] Exemplos de agentes de ácido nicotínico incluem, mas não estão limitados a niacin e probucol.

[00050] Exemplos de inibidores de absorção de colesterol incluem, mas não estão limitados a ezetimibe (Zetia).

[00051] Exemplos de inibidores de ACAT incluem, mas não estão limitados a Avasimibe, CI-976 (Parke Davis), CP - 113818 (Pfizer), PD - 138142- 15 (Parke Davis), F 1394, e outros numerosos descritos nas Patentes U.S. Nos. 6,204,278, 6,165,984, 6,127,403, 6,063,806, 6,040,339, 5,880,147, 5,621,010, 5,597,835, 5,576,335, 5,321,031, 5,238,935, 5,180,717, 5,149,709, e 5,124,337.

[00052] Exemplos de inibidores de CETP incluem, mas não estão limitados a Torcetrapib, CP-529414, CETi-I, JTT-705, e outros numerosos descritos nas Patentes U.S. Nos. 6,727,277, 6,723,753, 6,723,752, 6,710,089, 6,699,898, 6,696,472, 6,696,435, 6,683,099, 6,677,382, 6,677,380, 6,677,379, 6,677,375, 6,677,353, 6,677,341, 6,605,624, 6,586,448, 6,521,607, 6,482,862, 6,479,552, 6,476,075, 6,476,057, 6,462,092, 6,458,852, 6,458,851, 6,458,850, 6,458,849, 6,458,803, 6,455,519, 6,451,830, 6,451,823, 6,448,295, 5,512,548. Um exemplo de um antagonista FXR é Guggulsterone. Um exemplo de um ativador SCAP é GW532 (GlaxoSmithKline).

[00053] Exemplos de inibidores MTP incluem, mas não estão limitados a

amplitude e R - 103757. Exemplos de inibidores de sintase de escaleno incluem, mas não estão limitados a ácidos zaragóxicos. Exemplos de agonistas de PPAR incluem, mas não estão limitados a GW-409544, GW-501516, e LY-510929.

[00054] A invenção envolve identificar polimorfismos no gene Apo(a). Polimorfismos são variações alélicas que ocorrem em uma população. O polimorfismo pode ser um nucleotídeo único diferente presente em um locus, ou pode ser uma inserção ou deleção de um ou uns poucos nucleotídeos em uma posição de um gene. Como tal, um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é caracterizado pela presença em uma população de um ou dois, três ou quatro nucleotídeos (isto é, adenina, citosina, guanina ou timina), tipicamente menos que todos os quatro nucleotídeos, em um locus particular em um genoma tal como o genoma humano.

[00055] Aqueles versados na técnica irão prontamente reconhecer que as moléculas de ácido nucléico podem ser moléculas de cadeia dupla e que se referem a um sítio específico em uma cadeia se refere, também, ao sítio correspondente em uma cadeia complementar. Na definição de uma posição de SNP, alelo de SNP, ou sequência de nucleotídeo, com referência a uma adenina, uma timina (uridina), uma citosina, ou uma guanina em um sítio específico em uma cadeia de uma molécula de ácido nucléico também define a timina (uridina), adenina, guanina, ou citosina (respectivamente) no sítio correspondente em uma cadeia complementar da molécula de ácido nucléico. Desse modo, pode ser feito referência à cadeia a fim de se referir a uma posição de SNP, alelo de SNP, ou sequência de nucleotídeos. Sondas e iniciadores podem ser designados para hibridizar para a cadeia e os métodos de genotipagem de SNP descritos aqui podem de uma forma geral almejar a cadeia.

[00056] Determinar a identidade de um nucleotídeo no gene Apo(a) pode ser desempenhado, por exemplo, incubando a amostra de ácido nucléico com uma sonda ou iniciador de oligonucleotídeo que seletivamente hibridiza para ou próximo, respectivamente, uma molécula de ácido nucléico compreendendo o nucleotídeo e

detectar a hibridização seletiva do iniciador ou da sonda. A hibridização seletiva de uma sonda pode ser detectada, por exemplo, rotulando de forma detectável a sonda, e detectando a presença do rótulo utilizando uma análise de tipo de borrão tal como análise de borrão de Southern. A hibridização seletiva de um iniciador pode ser detectada, por exemplo, desempenhando uma reação de extensão de iniciador, e detectando um produto iniciador de reação de extensão. Se desejado, a reação de extensão do iniciador pode ser desempenhada como uma reação de cadeia de polimerase. O método pode incluir identificar um ou mais nucleotídeos.

[00057] Muitos procedimentos analíticos podem ser utilizados para detectar a presença ou ausência de nucleotídeos variantes nas posições polimórficas da invenção. Em geral, a detecção de variação alélica requer uma técnica de discriminação de mutação, opcionalmente uma reação de amplificação e opcionalmente um sistema de geração de sinal. Um número de técnicas de detecção de mutação, algumas baseadas em PCR pode ser utilizado em combinação com um número de sistemas de geração de sinal. Muitos métodos atuais para a detecção de variação alélica são revisados por Nollau et al., Clin. Chem. 43, 1114 - 1120, 1997; e em livros escolares padrão, por exemplo "Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. por U. Landegren, Oxford University Press, 1996 e "PCR", 2nd Edition by Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997. A detecção do gene Apo(a) SNP e métodos e reagentes de genotipagem estão descritos na Publicação do Pedido de Patente US2005/0272054A1 cujo conteúdo inteiro está aqui incorporado por referência.

[00058] Para determinar a identidade de percentagem de duas sequências de nucleotídeos ou sequências de dois aminoácidos de duas moléculas que compartilham a homologia de sequência, as sequências são alinhadas para propósitos de comparação ótima (por exemplo, uma lacuna pode ser introduzida em um ou em ambos de um primeiro e um segundo ácido nucléico ou sequência de

aminoácido para ótimo alinhamento e sequências não-homólogas podem ser desconsideradas para propósitos de comparação). Em algumas modalidades, pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90% ou mais do comprimento de uma sequência de referência está alinhada para propósitos de comparação. Os resíduos de aminoácido ou nucleotídeos nas posições de aminoácidos correspondentes ou posições de nucleotídeo são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência estiver ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleotídeo como a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas nesta posição (como utilizado aqui, “identidade” de aminoácido ou ácido nucléico for equivalente à “homologia” de aminoácido ou ácido nucléico). A identidade percentual entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências, levando em conta o número de lacunas, e o comprimento de cada lacuna, que necessita ser introduzida para o ótimo alinhamento das duas sequências.

[00059] A comparação de sequências e determinação de identidade percentual entre duas sequências podem ser acompanhadas utilizando um algoritmo matemático. (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; e Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Em algumas modalidades, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos é determinada utilizando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444 - 453 (1970))

[00060] Em algumas modalidades, a identidade percentual entre duas sequências de nucleotídeos é determinada utilizando o programa de GAP no pacote

de software GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Res.* 12(1):387 (1984)), utilizando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de lacuna de 40, 50, 60, 70, ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. Em outras modalidades, a identidade percentual entre duas sequências de nucleotídeo ou aminoácido é determinada utilizando o algoritmo de E. Myers e W. Miller (*CABIOS*, 4:11 - 17 (1989) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2,0), utilizando uma tabela de resíduo de peso PAM 120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12, e uma penalidade de lacuna de 4.

[00061] Para analisar os SNPs, este pode ser apropriado para utilizar oligonucleotídeos específicos para alelos de SNP alternativos. Tais oligonucleotídeos que detectam as variações de nucleotídeo único em sequências alvo podem ser referidos por através de tais termos como "oligonucleotídeos específicos de alelos", "sondas específicas de alelos", ou "iniciadores específicos de alelos". O projeto e uso de sondas específicas de alelo para analisar os polimorfismos são descritos em, por exemplo, *Mutation Detection A Practical Approach*, ed. Cotton et al. Oxford University Press, 1998; Saiki et al., *Nature* 324, 163 - 166 (1986); Dattagupta, EP235,726; and Saiki, WO 89/11548.

[00062] Enquanto o projeto de cada iniciador ou sonda de alelo específico depende das variáveis tais como a composição precisa das sequências nucleotídicas flanqueando uma posição de SNP em uma molécula de ácido nucléico alvo, e o comprimento do iniciador ou sonda, outro fator no uso de iniciadores e sondas é a severidade da condição sob a qual a hibridização entre a sonda ou o iniciador e a sequência alvo é desempenhado. Condições de maior severidade utilizam tampões com menos intensidade iônica e/ou uma maior temperatura de reação, e tendem a requerer um acoplamento mais perfeito entre a sonda / iniciador e uma sequência alvo a fim de formar um dúplex estável. Se a severidade for muito alta, portanto, a hibridização pode não ocorrer como por completa. Em contraste, condições menores

de severidade utilizam tampões com maior intensidade iônica e/ou uma temperatura de reação menor, e permitem a formação de dúplexes estáveis com bases mais incompatíveis entre uma sonda / primer e uma sequência alvo. A título de exemplo e não limitação, condições exemplares para condições de hibridização de severidade alta utilizando uma taxa de sonda de alelo específico como segue: Pré-hibridização com uma solução contendo 5X solução salina padrão de fosfato-EDTA (SSPE), 0,5% de NaDodSO<sub>4</sub> (SDS) a 55 °C, e sonda incubadora com moléculas de ácido nucléico alvo na mesma solução à mesma temperatura, seguida por lavagem com uma solução contendo 2X SSPE, e 0,1% SDS a 55 °C ou temperatura ambiente.

[00063] Condições moderadas de hibridização de severidade podem ser utilizadas para reações de extensão do iniciador de alelo específico com uma solução contendo, por exemplo, cerca de 50 mM de KCl a cerca de 46 °C. Alternativamente, a reação pode ser realizada a uma temperatura elevada tal como 60 °C. Em outra modalidade, uma condição de hibridização moderadamente severa para reações de ensaio de ligação de oligonucleotídeo (OLA) em que duas sondas são ligadas caso elas estejam completamente complementares à sequência alvo, pode utilizar uma solução de cerca de 100 mM de KCl a uma temperatura de 46°C.

[00064] Em um ensaio baseado na hibridização, as sondas de alelo específico podem ser designadas para que hibridizem a um segmento de DNA alvo proveniente de um indivíduo, mas não hibridizem ao segmento correspondente proveniente de outro indivíduo devido à presença de diferentes formas polimórficas (por exemplo, alelos / nucleotídeos de SNP alternativos) nos segmentos de DNA correspondentes provenientes de dois indivíduos. As condições de hibridização deveriam ser suficientemente severas para que exista uma diferença detectável significativa na intensidade de hibridização entre alelos, e preferencialmente uma resposta essencialmente binária, segundo o qual uma sonda hibridiza para apenas um dos alelos ou de forma significativa mais fortemente a um alelo. Enquanto uma sonda pode

ser designada para hibridizar para uma sequência alvo que contém um sítio de SNP tal que o sítio de SNP alinhe em qualquer lugar ao longo da sequência da sonda, a sonda é preferencialmente designada a hibridizar para um segmento da sequência alvo tal que o sítio de SNP alinha com uma posição central da sonda (por exemplo, uma posição dentro da sonda que seja pelo menos três nucleotídeos do final da sonda). Este projeto de sonda geralmente alcança boa discriminação na hibridização entre diferentes formas alélicas.

[00065] A sequência de nucleotídeos (polinucleotídeo ou oligonucleotídeo) pode ser de RNA ou pode ser de DNA, a qual pode ser um gene ou uma parte do mesmo, um cDNA, uma sequência de ácido polideoxirribonucléico sintético, ou similares, e pode ser de cadeia simples ou de cadeia dupla, bem como um DNA / RNA híbrido. Em várias modalidades, um polinucleotídeo, incluindo um oligonucleotídeo (por exemplo, uma sonda ou um iniciador) pode conter nucleosídeos ou nucleotídeos análogos, ou uma outra ligação da espinha dorsal que não uma ligação de fosfodiéster. Em geral, os nucleotídeos compreendendo um polinucleotídeo estão ocorrendo naturalmente em deoxirribonucleotídeos, tais como adenina, citosina, guanina ou timina ligadas a 2'-desoxirribose, ou ribonucleotídeos tais como adenina, citosina, guanina ou uracila ligadas ribose. No entanto, um polinucleotídeo ou oligonucleotídeo também podem conter nucleotídeos análogos, incluindo ocorrência não-naturalmente de nucleotídeos sintéticos ou ocorrência naturalmente modificada de nucleotídeos. Tais nucleotídeos análogos são bem-conhecidos na técnica e comercialmente disponíveis, como são polinucleotídeos contendo tais nucleotídeos análogos (Lin et al., Nucl. Acids Res. 22: 5220 - 5234(1994); Jellinek et al., Biochemistry 34: 11363 - 11372 (1995); Pagratis et al., Nature Biotechnol. 15:68 - 73 (1997), cada um dos quais é incorporado aqui por referência).

[00066] A ligação covalente ligando os nucleotídeos de um polinucleotídeo geralmente é uma ligação de fosfodiéster. No entanto, a ligação covalente também

pode ser qualquer de numerosas outras ligações, incluindo uma ligação de tiodiéster, uma ligação de fosforotioato, uma ligação tipo peptídeo ou qualquer outra ligação conhecida àqueles versados na técnica como útil para ligar nucleotídeos para produzir polinucleotídeos sintéticos (ver, por exemplo, Tarn et al., Nucl. Acids Res. 22: 977 - 986 (1994); Ecker and Crooke, BioTechnology 13:351360 (1995), cada um dos quais é aqui incorporado por referência). A incorporação de ocorrência não-naturalmente de nucleotídeos análogos ou ligações ligando os nucleotídeos ou análogos pode ser particularmente útil onde o polinucleotídeo estiver para ser exposto a um ambiente que contenha uma atividade nucleotídica, incluindo, por exemplo, um meio de cultura de tecido ou ao administrar a um indivíduo vivo, uma vez que os polinucleotídeos modificados possam ser menos suscetíveis à degradação.

[00067] Um polinucleotídeo ou oligonucleotídeo compreendendo nucleotídeos de ocorrência natural e ligações de fosfodiéster podem ser quimicamente sintetizadas ou pode ser produzido utilizando métodos de DNA recombinantes, utilizando um polinucleotídeo apropriado como um modelo. Em comparação, um polinucleotídeo ou oligonucleotídeo compreendendo nucleotídeos análogos ou outras ligações covalentes que não as ligações de fosfodiéster de um modo geral são quimicamente sintetizadas, embora uma enzima tal como T7 polimerase possa incorporar certos tipos de nucleotídeos análogos em um polinucleotídeo e, portanto, pode ser utilizado para produzir tal polinucleotídeo de forma recombinante a partir de um modelo apropriado (Jellinek et al., supra, 1995). Desse modo, o termo polinucleotídeo como utilizado aqui inclui moléculas de ácido nucléico ocorrendo naturalmente, as quais podem ser isoladas de uma célula, bem como de moléculas sintéticas, que podem ser preparadas, por exemplo, através de métodos de síntese química ou através de métodos enzimáticos tais como por reação de cadeia de polimerase (PCR).

[00068] A amostra de teste de ácido nucléico é convenientemente uma amostra de sangue, fluido de lavagem broncoalveolar, expectoração, ou outro fluido

corporal ou tecido obtido a partir de um indivíduo (por exemplo, humano). Será apreciado que a amostra de teste possa ser igualmente uma sequência de ácido nucléico correspondendo à sequência na amostra de teste, que é para dizer que toda ou uma parte da região na amostra de ácido nucléico pode primeiramente ser amplificada utilizando qualquer técnica conveniente, por exemplo, PCR, antes da análise de variação alélica.

[00069] Em várias modalidades, pode ser útil rotular de forma detectável um polinucleotídeo ou oligonucleotídeo. A rotulação de forma detectável de um polinucleotídeo ou de um oligonucleotídeo é bem-conhecida na técnica. Exemplos específicos não-limitantes de rótulos detectáveis incluem rótulos de quimiluminescência, radiorotulação, enzimas,

[00070] Um método de identificar um polimorfismo pode também ser desempenhado utilizando um membro de par de ligações específico. Como utilizado aqui, o termo “membro de par de ligações específico” se refere a uma molécula que se liga especificamente ou se hibridiza seletivamente a outro membro de um par de ligações específico. Os membros de par de ligações específico incluem, por exemplo, sondas, iniciadores, polinucleotídeos, anticorpos, etc. Por exemplo, um membro de par de ligações específico inclui um iniciador ou uma sonda que se hibridiza seletivamente a um polinucleotídeo que inclua um ponto de polimorfismo, ou que se hibridiza a um produto de amplificação gerado utilizando o polinucleotídeo alvo como um modelo.

[00071] Como utilizado aqui, o termo “interação específica”, ou “se liga especificamente” ou os similares significa que duas moléculas formam um complexo que é relativamente estável sob condições fisiológicas. O termo é utilizado aqui em referência a várias interações, incluindo, por exemplo, a interação de um anticorpo que se liga a um polinucleotídeo que inclua um sítio de polimorfismo; ou a interação de um anticorpo que se liga a um polipeptídeo que inclua um aminoácido que seja

codificado por um códon que inclua um sítio de polimorfismo.

[00072] De acordo com os métodos da invenção, um anticorpo pode se ligar seletivamente a um polipeptídeo que inclua um aminoácido específico codificado por um códon que inclui um sítio de polimorfismo. Alternativamente, um anticorpo pode se ligar preferencialmente a um nucleotídeo modificado específico que seja incorporado em um sítio de polimorfismo para somente certas ocorrências de nucleotídeos no sítio de polimorfismo, por exemplo, utilizando um ensaio de extensão de iniciador.

[00073] Uma interação específica geralmente é estável sob condições fisiológicas, incluindo, por exemplo, condições que ocorrem em um indivíduo vivo tal como um humano ou outro vertebrado ou invertebrado, bem como condições que ocorrem em uma cultura celular tal como utilizado para manter células mamíferas ou células provenientes de outros organismos vertebrais ou um organismo invertebral. Os métodos para determinar se duas moléculas especificamente se interagem são bem-conhecidos e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, ressonância da superfície de plasma, e os similares.

[00074] Números métodos são conhecidos na técnica para determinar a ocorrência de nucleotídeo para um polimorfismo específico em uma amostra. Tais métodos podem utilizar uma ou mais sondas ou iniciadores de oligonucleotídeos, incluindo, por exemplo, um par iniciador de amplificação, que se hibridiza seletivamente a um polinucleotídeo alvo, que contém um ou mais polimorfismo no gene Apo(a).

[00075] Um iniciador de alelo específico é utilizado, geralmente junto com um iniciador constante, em uma reação de amplificação tal como uma reação PCR, que provê a discriminação entre alelos através da amplificação seletiva de um alelo em uma posição de sequência específica, por exemplo, como utilizado para ensaios ARMS™. O iniciador de alelo específico é preferencialmente de 17 a 50 nucleotídeos, mais preferencialmente de cerca de 17 a 35 nucleotídeos, mais preferencialmente de

cerca de 17 a 30 nucleotídeos.

[00076] Um iniciador de alelo específico preferencialmente corresponde de forma exata ao alelo a ser detectado, porém derivados do mesmo são também contemplados em que cerca de 6 a 8 dos nucleotídeos na terminação 3' corresponde ao alelo a ser detectado e em que até 10, tal como até 8, 6, 4, 2, ou 1 dos nucleotídeos restantes podem ser variados sem afetar significativamente as propriedades do iniciador.

[00077] Os iniciadores podem ser manufaturados utilizando qualquer método convencional de síntese. Exemplos de tais métodos podem ser encontrados em livros escolares padrão, por exemplo "Protocols for Oligonucleotides and Analogues; Synthesis and Properties," Methods in Molecular Biology Series; Volume 20; Ed. Sudhir Agrawal, Humana ISBN: 0-89603-247-7; 1993; 1st Edition. Se requerido(s), o(s) iniciador(s) pode(m) ser rotulado(s) para facilitar a detecção.

[00078] Uma sonda de oligonucleotídeo de alelo específico pode ser utilizada para detectar o polimorfismo do gene Apo(a) na posição definida aqui. O projeto de tais sondas será aparente aos versados na técnica de biologia molecular. Tais sondas são de qualquer comprimento conveniente tal como até 50 bases, até 40 bases, mais convenientemente até 30 bases em comprimento, tal como, por exemplo, 8 a 25 ou 8 a 15 bases em comprimento. Em geral, tais sondas irão compreender sequências de bases inteiramente complementares aos correspondentes tipos selvagens ou locus variantes no gene. No entanto, se requerido uma ou mais incompatibilidades podem ser introduzidas, providas para que a potência de discriminação da sonda de oligonucleotídeo não seja desnecessariamente afetada. As sondas da invenção podem carregar um ou mais rótulos para facilitar a detecção.

[00079] As sondas de oligonucleotídeos úteis na prática de um método da invenção podem incluir, por exemplo, um oligonucleotídeo que seja complementar a e atravesse uma parte do polinucleotídeo, incluindo a posição do polimorfismo, em

que a presença de um nucleotídeo específico na posição é detectada através da presença ou ausência de hibridização seletiva da sonda. Tal método pode ainda incluir contatar o polinucleotídeo alvo e o oligonucleotídeo hibridizado com uma endonuclease, e detectar a presença ou ausência de um produto de clivagem da sonda, dependendo de se a ocorrência de nucleotídeo no sítio de polimorfismo é complementar ao nucleotídeo correspondente da sonda.

[00080] Um ensaio de ligação de oligonucleotídeo pode também ser utilizado para identificar uma ocorrência de nucleotídeo em uma posição polimórfica, em que um par de sondas que se hibridizam seletivamente a montante e adjacente a e a jusante e adjacente ao sítio do polimorfismo, e em que uma das sondas inclui um nucleotídeo terminal complementar a uma ocorrência de nucleotídeo do polimorfismo. Onde o nucleotídeo terminal da sonda for complementar à ocorrência de nucleotídeo, a hibridização seletiva inclui o nucleotídeo terminal tal que, na presença de uma ligase, os oligonucleotídeos a montante e a jusante estão ligados. Como tal, a presença ou ausência de um produto de ligação é indicativa da ocorrência de nucleotídeo no sítio de polimorfismo.

[00081] Um oligonucleotídeo também pode ser útil como um iniciador, por exemplo, para uma reação de extensão de iniciador, em que o produto (ou ausência do produto) da reação de extensão é indicativo de ocorrência de nucleotídeo. Além disso, um par iniciador útil para amplificar uma parte do polinucleotídeo incluindo o sítio SNP pode ser útil, em que o produto de amplificação é examinado para determinar a ocorrência de nucleotídeo no sítio de polimorfismo. Métodos particularmente úteis incluem aqueles que são prontamente adaptáveis ao formato de alto rendimento, ao formato multiplex, ou a ambos. A extensão do iniciador ou produto de amplificação pode ser detectado diretamente ou indiretamente e/ou pode ser sequenciado utilizando vários métodos conhecidos na técnica. Os produtos de amplificação que atravessam um locus de polimorfismo pode ser sequenciado

utilizando metodologias tradicionais de sequência (por exemplo, o “método de terminação de cadeia mediada por dideoxi”, também conhecido como “Método Sanger” (Sanger, F., et al., J. Molec. Biol. 94: 441 (1975); Prober et al. Science 238: 336-340 (1987) ) e o “método de degradação química” também conhecido como “método Maxam-Gilbert” (Maxam, A. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 74: 560 (1977) ), ambas as referências são aqui incorporadas por referência) para determinar a ocorrência de nucleotídeo no loci de SNP.

[00082] Métodos que podem determinar a identidade de um nucleotídeo no gene Apo(a) incluem utilizar um método de “microsequenciamento”. Os métodos de microsequenciamento determinam a identidade de apenas um nucleotídeo único em um sítio “predeterminado”. Tais métodos possuem utilidade específica na determinação da presença e identidade de polimorfismos em um polinucleotídeo alvo.

[00083] Tais métodos de microsequenciamento, bem como outros métodos para determinar a ocorrência de nucleotídeo em um loci de polimorfismo são discutidos em Boyce-Jacino, et al., Pat. U.S. No. 6,294,336, incorporado aqui por referência.

[00084] Os métodos de microsequenciamento incluem o método Genetic Bit Analysis descrito por Goelet, P. et al. (WO 92/15712, aqui incorporado por referência). Adicionalmente, procedimentos de incorporação de nucleotídeo guiado pelo iniciador para sítios polimórficos de ensaio no DNA foram também descritos (Komher, J. S. et al, Nucl. Acids. Res. 17: 7779 - 7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18: 3671 (1990); Syvanen, A. - C, et al., Genomics 8: 684-692 (1990); Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 88: 1143 - 1147 (1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1 : 159 - 164 (1992); Ugozzoli, L. et al., GATA 9: 107-112 (1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208: 171 - 175 (1993); e Wallace, W089/10414). Estes métodos diferem do Genetic Bit. Análises em que eles todos contam com a incorporação de deoxinucleotídeos rotulados para discriminar entre as bases em um sítio polimórfico.

Em tal formato, uma vez que o sinal é proporcional ao número de deoxinucleotídeos incorporados, os polimorfismos que ocorrem na execução do mesmo nucleotídeo podem resultar em sinais que são proporcionais ao comprimento da execução (Syvanen, A. -C, et al. Amer. J. Hum. Genet. 52: 46 - 59 (1993)).

[00085] Métodos de microssequenciamento forma providos por Mundy, C. R. (Pat. U.S. No. 4,656, 127) e Cohen, D. et al. (French Patent 2,650, 840; PCT Appln. No.W091/02087) que discutem um método baseado na solução para determinar a identidade do nucleotídeo de um sítio polimórfico. Como no método de Mundy da Pat. U.S. No. 4,656,127, um iniciador é empregado para que seja complementar às sequências alélicas 3' imediatamente ao sítio polimórfico.

[00086] Em resposta às dificuldades encontradas no emprego de eletroforeses de gel para sequências de análise, métodos alternativos para microssequenciamento foram desenvolvidos. Macevicz (Pat.U.S. No. 5,002,867), por exemplo, descreve um método para determinar a sequência de ácido nucléico via hibridização com múltiplas misturas de sondas de oligonucleotídeos. De acordo com tais métodos, a sequência de um polinucleotídeo alvo é determinada permitindo o alvo hibridizar sequencialmente com conjuntos de sondas possuindo um nucleotídeo variante em uma posição, e um nucleotídeo variante em outras posições. O método de Macevicz determina a sequência de nucleotídeo do alvo hibridizando o alvo com um conjunto de sondas, e então determinando o número de sítios que pelo menos um membro do conjunto é capaz de se hibridizar ao alvo (isto é, o número de "acoplamentos"). Este procedimento é repetido até que cada membro de um conjunto de sondas tenha sido testado.

[00087] Boyce-Jacino, et al., Pat. U.S. No. 6,294,336 provê um método de sequenciamento de fase sólida para determinar a sequência de moléculas de ácido nucléico (tanto DNA ou RNA) utilizando um iniciador que liga seletivamente a polinucleotídeo alvo a um sítio em que o SNP é o nucleotídeo 3' mais seletivamente

ligado ao alvo.

[00088] Do mesmo modo, utilizando os métodos descritos acima, o alelo de haplotipo relacionado à resposta ao ácido acetilsalicílico ou a ocorrência de nucleotídeo do SNP relacionado à resposta ao ácido acetilsalicílico pode ser identificado utilizando uma reação de amplificação, uma reação de extensão do iniciador, ou um imunoensaio

[00089] O alelo de haplotipo relacionado à resposta ao ácido acetilsalicílico ou a ocorrência de nucleotídeo do SNP relacionado à resposta ao ácido acetilsalicílico pode ser identificado contactando polinucleotídeos na amostra ou derivados de polinucleotídeos provenientes da amostra, com um membro do par de ligações específico que se hibridiza seletivamente a uma região de polinucleotídeo compreendendo o SNP relacionado à resposta ao ácido acetilsalicílico, sob condições em que o membro do par de ligações se liga especificamente a ou próximo ao SNP relacionado à resposta ao ácido acetilsalicílico. O membro do par de ligações específico pode ser um anticorpo ou um polinucleotídeo.

[00090] Os anticorpos que são utilizados nos métodos da invenção incluem anticorpos que ligam especificamente polinucleotídeos que englobam polimorfismos no gene Apo(a). Além disso, os anticorpos ligam polipeptídios que incluem um aminoácido codificado por um códon que inclui o polimorfismo. Estes anticorpos se ligam a um polipeptídeo que inclui um aminoácido que seja codificado em parte pelo polimorfismo. Outros métodos que podem ser utilizados incluem métodos de genotipagem que incorporam um nucleotídeo modificado que seja subsequentemente reconhecido por um anticorpo tal como, por exemplo, Illumina's Infinium II Assay.

[00091] Os anticorpos especificamente se ligam a um polipeptídeo que inclua um primeiro aminoácido codificado por um códon que inclui o loci de polimorfismo, porém não liga, ou liga de forma mais fraca a um polipeptídeo que inclua um segundo aminoácido codificado por um códon que inclui uma ocorrência de nucleotídeo

diferente no gene Apo(a).

[00092] Os anticorpos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos policlonal, monoclonal, multiespecífico, humano, humanizado ou quimérico, anticorpos de cadeia simples, fragmentos Fab, fragmentos F (ab<sup>1</sup>), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id para os anticorpos da invenção), e fragmentos de ligação epítipo de quaisquer dos acima. As moléculas de imunoglobulina da invenção podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de moléculas de imunoglobulina.

[00093] Os anticorpos incluem fragmentos de anticorpos que incluem, mas não estão limitados a, Fab, Fab' e F (ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub>, Fd, Fvs (scFv) de cadeia simples, anticorpos de cadeia simples, Fvs(sdFv) ligado a dissulfeto e fragmentos compreendendo um domínio VL ou VH. Os fragmentos de anticorpos de ligação de antígeno, incluindo anticorpos de cadeia simples, podem compreender a(s) região(ões) variável(is) sozinhas ou em combinação com inteira ou parte da seguinte: região de articulação, domínios de CH1, CH2, e CH3. Também estão incluídos os fragmentos de ligação de antígeno também compreendendo qualquer combinação de região(ões) variável(is) com uma região de articulação, domínios de CH1, CH2, e CH3. Os anticorpos podem ser provenientes de qualquer origem de animal incluindo pássaros e mamíferos. Preferencialmente, os anticorpos são humanos, murinos (por exemplo, camundongos e ratazanas), burro, coelho de navio, cabra, porquinho da índia, camelo, ou galinha. Os anticorpos podem ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos ou de maior multiespecificidade.

[00094] Os anticorpos podem ser gerados através de qualquer método conhecido na técnica. Os anticorpos policlonais para um interesse de antígeno podem ser produzidos através de vários procedimentos bem-conhecidos na técnica. Por

exemplo, um polipeptídeo da invenção pode ser administrado a vários animais hospedeiros incluindo, mas não limitada a, coelhos, ratinhos, ratazanas, etc. para induzir a produção de soro contendo anticorpos policlonais específicos para o antígeno. Vários adjuvantes podem ser utilizados para aumentar a resposta imunológica, dependendo das espécies de hospedeiros, e inclui, mas não está limitado a, geles minerais de Freund (completo e incompleto), tais como hidróxido de alumínio, substâncias de superfície ativa tal como lisolecitina, polióis plurônicos, polianions, peptídeos, emulsões oleosas, hemocianinas de lapa pessoal (keyhole limpet hemocyanins), dinitrofenol, e adjuvantes humanos potencialmente úteis tal como BCG (bacille Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes são também bem-conhecidos na técnica.

[00095] Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na arte incluindo o uso de tecnologias de hibridoma, recombinantes, e de exibição de fago, ou uma combinação dos mesmos. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando técnicas de hibridoma incluindo aquelas conhecidas na técnica e ensinadas, por exemplo, em Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (as ditas referências incorporadas aqui por referência em sua totalidade). O termo "anticorpo monoclonal" como utilizado aqui não é limitado a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. O termo "anticorpo monoclonal" se refere a um anticorpo que é derivado de um único clone, incluindo qualquer eucariótico, procariótico, ou clone de fago, e não o método pelo qual é produzido.

[00096] Após toda a informação do fenótipo e genótipo relevantes ter sido obtida, análises estatísticas são realizadas para determinar se existe qualquer correlação significativa entre a presença de um alelo ou um genótipo com as

características de fenótipo de um indivíduo. Frequências alélicas, estáticas de equilíbrio de Hardy-Weinberg, e desequilíbrio de ligação (LD) entre SNPs podem ser calculados. Haplotipos podem então ser calculados, por exemplo, um algoritmo EM (Excoffier and Slatkin, *Mol Biol Evol.* 1995 Sep; 12 (S): 921 - 7). Existem também outros métodos para inferir haplotipos que não utilizam a abordagem EM para estimar a frequência. Estes métodos são baseados nas reconstruções de história evolucionária, incluindo recombinação e o coalescente, e são representados em, por exemplo, o programa PHASE (Stephens, M., Smith, N., and Donnelly, P. *American Journal of Human Genetics*, 68, 978-989, 2001). Em adição a vários parâmetros tais como coeficientes de desequilíbrio de ligação, frequências de alelo, estatísticas qui-quadradas e outros parâmetros genéticos da população tais como índices de Fst podem ser calculados para controlar étnico, ancestral ou outras variações sistemáticas entre o caso e o grupo de controle.

[00097] Preferencialmente, a inspeção e clareza de dados são primeiro desempenhados antes de realizar testes estatísticos para associação genética. Dados epidemiológicos e clínicos das amostras podem ser resumidos através de estatísticas descritivas com tabelas e gráficos. A validação de dados é preferencialmente desempenhada para verificação para finalização de dados, entradas inconsistentes, e valores extremos. Teste qui-quadrados e t-testes (teste da soma dos números de ordem de Wilcoxon se as distribuições não estiverem normais) podem ser utilizadas para verificar para diferenças significantes entre os casos e controles para variáveis contínuas e discretas, respectivamente. Para assegurar a qualidade da genotipagem, testes de desequilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser desempenhados nos casos e controles separadamente. O desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em ambos os casos e controles para marcadores individuais pode ser indicativo de erro de genotipagem. Se o HWE for violado em uma maioria de marcadores, é indicativo de subestrutura de população que seria adicionalmente

investigado. Além disso, o desequilíbrio de Hardy- Weinberg nos casos somente pode indicar associação genética dos marcadores com a doença (Genetic Data Analysis, Weir B., Sinauer (1990)).

[00098] Para testar se um alelo de um único SNP está associado ao status de caso ou controle de um traço fenotípico, um versado na técnica pode comparar frequências de alelo nos casos e controles. Os testes qui-quadrados padrão e teste exatos de Fisher podem ser realizados em uma tabela 2 X 2 (alelos de 2 SNP resultam no traço categórico de interesse). Para testar se os genótipos de um SNP estão associados, testes qui-quadráticos podem ser realizados em uma tabela 3 X 2 (resulta em 3 genótipos X 2). Os testes de pontuação são também realizados para associação genotípica para contrastar as três frequências genotípicas (maiores homozigotos, heterozigotos e menores homozigotos) nos casos e controles, e buscar por direções utilizando 3 diferentes modos de herança, a saber dominante (com coeficientes de contraste 2, -1, -1), aditivos (com coeficientes de contraste 1, 0, -1) e recessivos (com coeficientes de contraste 1, 1, -2). Razões ímpares para variantes de heterozigotos e homozigotos versus os genótipos tipo selvagem são calculadas com os limites confidentes desejados, usualmente 95%.

[00099] Os polimorfismos com valor para distinguir a matriz do caso a partir do controle, se houver, podem ser apresentados na forma matemática descrevendo qualquer relacionamento e acompanhados por estatísticas de associação (teste e efeito). Um resultado da análise estatística que mostra uma associação de um marcador de polimorfismo com uma resposta de ácido acetilsalicílico com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, ou 99%, mais preferencialmente 95% de confiança, ou alternativamente uma probabilidade de menos insignificância que 0,05, podem ser utilizadas.

[000100] Em um aspecto, os métodos de diagnóstico da invenção são utilizados para acessar os farmacogenéticos do tratamento com ácido acetilsalicílico

para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. Indivíduos que carregam variantes alélicas específicas do gene Apo(a) pode, por conseguinte, exibir capacidades alteradas para reagir a diferentes agentes ou terapias tais como tratamento com ácido acetilsalicílico. Isto pode ter um efeito direto na resposta de um indivíduo à terapia de fármaco. Os métodos de diagnóstico podem ser úteis tanto para prever a resposta clínica ao tratamento com ácido acetilsalicílico como para determinar a dose terapêutica.

[000101] Desse modo, a presente invenção provê métodos para selecionar ou formular um regime de tratamento (por exemplo, métodos para determinar se administra ou não ácido acetilsalicílico a indivíduo os métodos para selecionar um regime de tratamento específico tal como dosagem e frequência de administração de ácido acetilsalicílico, ou selecionar um tratamento antitrombótico alternativo (isto é, outro que não o ácido acetilsalicílico) para indivíduos que são previstos serem improváveis de responder ao tratamento com ácido acetilsalicílico, e métodos para determinar a probabilidade de experimentar toxicidade ou outros efeitos laterais indesejáveis provenientes do tratamento com ácido acetilsalicílico, etc.). A presente invenção também provê métodos para selecionar indivíduos para quem o tratamento com ácido acetilsalicílico ou outro tratamento será administrado com base no genótipo do indivíduo, e métodos para selecionar indivíduos para um ensaio clínico de um tratamento com ácido acetilsalicílico ou outro agente terapêutico baseado nos genótipos dos indivíduos (por exemplo, selecionar indivíduos para participarem no ensaio que sejam mais prováveis de responder positivamente ao tratamento com ácido acetilsalicílico).

[000102] Os SNPs da presente invenção podem também ser utilizados para identificar novos alvos terapêuticos. Por exemplo, genes contendo o polimorfismo ou seus produtos, bem como genes ou seus produtos que são diretamente ou indiretamente regulados por ou interagidos com estes polimorfismos ou seus

produtos, podem ser almejados para o desenvolvimento de terapêuticos. Os métodos da invenção são utilizados no desenvolvimento de novas terapias de fármacos que almejam seletivamente uma ou mais variantes do gene Apo(a). A identificação de um elo entre uma variante específica e predisposição ao desenvolvimento de doença ou resposta ao tratamento com fármaco pode ter um impacto significativo no projeto de novos fármacos. Os fármacos podem ser designados para regular a atividade biológica de variantes implicadas nos processos da doença. Os terapêuticos podem ser compostos de, por exemplo, moléculas pequenas, proteínas, fragmentos ou peptídeos de proteínas, anticorpos, ácidos nucleicos, ou seus derivados ou miméticos que modulam as funções ou níveis dos genes alvo ou produtos do gene.

[000103] De acordo com outro aspecto da invenção, existe provido um kit diagnóstico compreendendo uma sonda de nucleotídeo de alelo específico da invenção e/ou um iniciador de alelo específico da invenção. Os kits diagnósticos podem compreender empacotamento apropriado e instruções para uso nos métodos da invenção. Tais kits podem ainda compreender tampão(ões) apropriado(s) e polimerase(s) tais como polimerases termoestáveis, por exemplo, polimerase taq.

[000104] Em outro aspecto da invenção, os polimorfismos de nucleotídeo único desta invenção podem ser utilizados como marcadores genéticos em estudos de ligação. Isto particularmente se aplica os polimorfismos de frequências relativamente altas. Polimorfismos de baixa frequência podem ser particularmente úteis para haplotipagem como descrito abaixo. Uma haplotipagem é um conjunto de alelos encontrados nos sítios polimórficos ligados (tais como dentro de um gene) ou um único cromossomo (paternal ou maternal). Se a recombinação dentro do gene for aleatória, pode haver tanto quanto  $2^n$  haplotipos, onde 2 é o número de alelos em cada SNP e n é o número de SNPs. Uma aproximação para identificar mutações ou polimorfismos que sejam correlacionadas com resposta clínica é realizar um estudo da associação utilizando todos os haplotipos que podem ser identificados na

população de interesse. A frequência de cada haplotipo é limitada pela frequência de seu alelo mais raro, para que os SNPs sem alelos de baixa frequência sejam particularmente úteis como marcadores de haplotipos de baixa frequência. Como mutações ou polimorfismos específicos associados a certas características clínicas são prováveis de serem de baixa frequência dentro da população, SNPs de baixa frequência podem ser particularmente úteis na identificação destas mutações.

[000105] De acordo com outro aspecto da presente invenção existe provido um método de tratamento. O método de tratamento compreende selecionar um indivíduo humano com base em que o indivíduo humano possua um polimorfismo de Apo(a) caracterizado por citosina ou guanina no cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) e administrar ao indivíduo uma dose específica de ácido acetilsalicílico (por exemplo, um agente antitrombótico tal como uma tienopiridina ou um derivado de tienopiridina) para reduzir o risco de um evento cardiovascular adverso devido ao indivíduo possuir o polimorfismo.

[000106] Preferencialmente, a determinação do status do indivíduo humano é clinicamente útil. Exemplos de utilidade clínica incluem decidir que fármaco antitrombótico ou fármacos administrar e/ou em decidir sobre a quantidade eficaz do fármaco ou fármacos. Exemplos de agentes antitrombóticos são providos acima.

[000107] A invenção refere-se a métodos para avaliar uma responsividade do indivíduo humano ao tratamento com ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro. Os métodos da invenção são baseados, em parte, determinando a identidade de um nucleotídeo na posição 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1 ; rs3798220 dbSNP @ NCBI) de um gene Apo(a) do indivíduo que, sozinho ou em combinação, permite uma inferência a ser desenhada como para a resposta ao ácido acetilsalicílico do indivíduo. A resposta ao ácido acetilsalicílico pode ser uma redução no risco de um distúrbio cardiovascular.

Como tal, as composições e métodos da invenção são úteis, por exemplo, para identificar indivíduos ou pacientes que sejam mais ou menos prováveis a responder ao tratamento com ácido acetilsalicílico ou ao tratamento com um outro agente antitrombótico que não o ácido acetilsalicílico. As composições e métodos da invenção são também úteis para predizer ou determinar que um indivíduo ou paciente possa requerer uma dose alterada de ácido acetilsalicílico ou de um outro agente antitrombótico que não o ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um distúrbio cardiovascular.

[000108] De acordo com outro aspecto da invenção, um ensaio é provido. O ensaio envolve blindagem por um agente que se liga preferencialmente à proteína de Apo(a) (por exemplo, proteína de Apo(a) isolada) ou a Lp(A) codificada por um gene Apo(a) possuindo citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI).

[000109] A invenção também provê outro ensaio. O ensaio envolve a blindagem por um agente que se liga preferencialmente à proteína de Apo(a) (por exemplo, proteína de Apo(a) isolada) ou a Lp(a) codificada por um gene Apo(a) possuindo timina ou adenina na posição do cromossomo 6: 160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI).

[000110] Os ensaios de blindagem podem ser utilizados para selecionar dentre aqueles agentes antitrombóticos que preferencialmente se ligam a um polimorfismo. O projeto de fármaco racional pode ser realizado através de alteração ou fabricando versões de agentes antitrombóticos existentes e então testa a capacidade relativa de tais versões para ligarem preferencialmente um ou outro polimorfismo no ensaio de projeção da invenção. Bibliotecas químicas semelhantes de existência ou novos agentes podem ser blindadas para tais ligações.

[000111] O versado na técnica é familiar com as metodologias de blindagem.

Os ensaios de blindagem incluem ensaios que medem a capacidade de um agente se ligar a uma proteína Lp(a). Por exemplo, blindagem por um agente que se liga preferencialmente a um polimorfismo de Lp(a) que compreende contatar o agente com o polimorfismo de uma Lp(a), determinar a ligação do agente ao polimorfismo de uma Lp(a), comparar a ligação do agente ao polimorfismo de uma Lp(a) não contendo o polimorfismo, em que uma ligação aumentada do agente a um polimorfismo de uma Lp(a) comparada à ligação do agente ao polimorfismo de uma Lp(a) não contendo o polimorfismo indica que o agente é um agente antitrombótico com eficácia aperfeiçoada no polimorfismo de uma Lp(a) e em que uma ligação diminuída do agente a um polimorfismo de uma Lp(a) comparada à ligação do agente ao polimorfismo de uma Lp(a) não contendo o polimorfismo indica que o agente é um agente antitrombótico com eficácia reduzida para o polimorfismo da Lp(a). O versado na técnica é familiar com esta e outras metodologias de blindagem incluindo, mas não limitado a ensaios de ligação direta, ensaios de ligação competitiva, ensaios de ligação não-competitivas, ensaios de inibição funcional, ensaios de blindagem de alto rendimento e os similares.

[000112] A invenção é ilustrada, mas não limitada pelas referências aos Exemplos a seguir:

#### Exemplos

##### Exemplo 1:

Lipoproteína (a) [Lp(a)] é uma fração do plasma que consiste em uma única molécula de (Apo(a)) ligada covalentemente através de uma ligação de dissulfeto a uma molécula de apolipoproteína B-100 juntamente com lipídios ricos em colesterol (1). Enquanto as funções biológicas de Lp(a) permaneçam incertas (2, 3), altos níveis de Lp(a) foram associados ao risco cardiovascular aumentado (CV), particularmente quando LDL-C for também elevado (4 a 6). Os aspectos de comportamento de colesterol de Lp(a) possuem investigação amplamente focada de risco cardiovascular

associado na biologia baseada em lipídio (7 a 11). No entanto, apolipoproteína (a) é também altamente homóloga a plasminogênio, e apesar de uma falta de atividade proteolítica reconhecida na apolipoproteína (a), esta homologia possui investigações alternativas focadas de risco cardiovascular na função da Lp(a) em hemostases, função de plaquetas, e trombose (12 a 18).

[000113] O locus da apolipoproteína (a) está dentre os mais polimórfico no genoma humano. A variação genética da apolipoproteína (a) foi associada com a ampla faixa de níveis de Lp(a) e conta amplamente para a hereditariedade de Lp(a) (19-22). A maioria das variações conhecidas que influenciam os níveis de Lp(a) tomam a forma de entre 3 e 40 repetições do domínio tipo 2 de Kringle (Kr) IV localizado na direção do término de amino da proteína (1, 23). Este alto nível de polimorfismo de Kr IV tipo 2 teve apresentado um desafio para medir os níveis de plasma de Lp(a) até que o desenvolvimento recente de reagentes de ensaio que reconhecem o domínio único de Kr V da apolipoproteína (a) e não reage de forma cruzada com as repetições de Kr IV tipo 2 (24, 25). Outras variações do gene da apolipoproteína (a) que foram associadas aos níveis de Lp(a) incluem polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) bem como polimorfismos de deleção de inserção, notavelmente de uma sequência de pentanucleotídeo, TTTTA, no promotor (26 a 28). Em adição, o polimorfismo do locus da apolipoproteína (a) parece envolver variação do número de cópias (29).

[000114] Recentemente, o SNP rs3798220, encodifica uma isoleucina para substituição de metionina no domínio de plasminogênio tipo protease da apolipoproteína (a), foi sugerido como um novo candidato para associação com ambos os níveis de Lp(a) e doenças cardiovasculares prevalentes (Luke et al., submitted (30)). O genótipo deste polimorfismo foi portanto determinado dentre 26,274 inicialmente mulheres saudáveis do Women's Health Study (WHS) que foram aleatoriamente alocadas para dose de aspirina ou placebo e então seguida durante

um período de 10 anos para incidente de eventos cardiovasculares (31). Este ajuste permitiu a oportunidade por estimação prospectiva não somente de associação de rs3798220 com níveis de Lp(a) e risco vascular, mas também de uma interação entre efeitos da aspirina e genéticos no risco. Embora a maioria dos participantes do estudo fossem Caucasianos, houve números suficientes de participantes não-Caucasianos para locais de influências específicas de população entre rs3798220 e níveis de Lp(a), como foi encontrado em prévias comparações de outras variantes da apolipoproteína (a) dentre as populações com diferentes ancestrais biogeográficos (32 a 36).

[000115] Dentre 25,038 participantes Caucasianos no WHS, o menor alelo de rs3798220 no gene da apolipoproteína (a) foi carregado por 904 (3,6%) heterozigotos e 15 (0,06%) homozigotos para uma frequência menor de alelo de 1,9%. Estes genótipos representam um desvio da divisória do equilíbrio de Hardy- Weinberg ( $p = 0,048$ ) devido à leve deficiência de heterozigotos e excesso de homozigotos do menor alelo. Idade, IBM, taxas de fumo, uso de terapia de reposição de hormônio, e status de menopausa bem como incidência de hipertensão e diabetes não foram diferentes dentre as três classes genóticas (Tabela 1). No entanto, níveis médios de Lp(a) em heterozigotos (79,3 mg/dL) e veículos homozigotos do menor alelo (153,9 mg/dL) foram respectivamente oito e 15 vezes maior que os níveis de Lp(a) em não-veiculares (10,0 mg/dL,  $p \ll 0,001$ ) (Tabela 1, Figura 1A, B). Este efeito parece o mais modesto subjacente, porém elevações significantes do colesterol total das frações de plasma relacionados, LDL-C, e apolipoproteína B como julgado pela eliminação de significância após ajuste para os níveis de Lp(a). Outros biomarcadores, incluindo marcadores de inflamação e outras frações de lipídio, não foram associados ao genótipo rs3798220. Essencialmente resultados idênticos foram encontrados na análise combinando os heterozigotos com os veículos homozigotos do menor alelo em comparações de características clínicas com não-veículos (dados não mostrados).

[000116] A distribuição de níveis de Lp(a) dentre heterozigotos Caucasianos

foi inteiramente diferente daquela dentre não-veículos e teve um padrão totalmente bimodal que permitiu estratificação desta subpopulação em um grupo com Lp(a) maior que 27,9 mg/dL (média 92,4 mg/dL, N = 627) e um segundo grupo com menos Lp(a) que 27,9 mg/dL (média 5,0 mg/dL, N = 260) (Figura 1A-C). Todos os veículos homozigotos do menor alelo tiveram níveis de Lp(a) maiores que 27,9 mg/dL, porém houveram muito poucos indivíduos neste grupo para avaliar a forma de distribuição de Lp(a) (Figura 1B). A distribuição bimodal de Lp(a) dentre os heterozigotos rs3798220 foi confirmada em uma segunda população não-relacionada de 1058 homens Caucasianos do Physicians' Health Study (PHS) onde a frequência do menor alelo de rs3798220 foi 1,8%, similar a sua frequência no WHS de mulheres Caucasianas (Figura 1D).

[000117] Os níveis naturais de Lp(a) dentre heterozigotos Caucasianos poderia não ser explicado pelas características clínicas padrão. Por exemplo, não houve diferenças significantes na comparação de mulheres heterozigotas Caucasianas com Lp(a) baixa ou alta em termos de idade, BMI, fumo, diabetes, status de menopausa, hipertensão histórico familiar de doença cardíaca, ou uso de terapia de reposição de hormônio. Similarmente, HDL-C, apoliproteína A1, triglicerídeos, proteína reativa C, ICAM-I solúvel, fibrinogênio, creatinina, homocisteína, e HbA1c foram todos comparáveis nas duas subpopulações dos heterozigotos, e similares ao nível dentre homozigotos para o maior alelo. Além disso, atribuições geográficas brutas através dos Estados Unidos não sugerem uma base regional para os níveis de Lp(a) bimodal. Níveis de LDL-C, colesterol total, e apoliproteína B foram significativamente elevados em heterozigotos com Lp(a) alto comparado com baixo Lp(a) (médias: LDL-C, 130,5 mg/dL v. 122,5 mg/dL; colesterol total, 219,0 mg/dL v. 210,4 mg/dL; apolipoproteína B, 109,9 mg/dL v. 103,1 mg/dL; todo  $p < 0,01$ ), porém as diferenças não foram novamente significantes após ajuste através de Lp(a). Desse modo, os maiores níveis destes lipídios observados pelo todo dentre heterozigotos

podem ser explicados pelo aumento na Lp(a). As distribuições bimodais não foram observadas por quaisquer destes lipídios dentre os participantes do WHS heterozigotos Caucasianos.

[000118] Uma simples cópia do menor alelo de rs3798220 em heterozigotos conferiu um aumento aproximado de 50% no risco de um evento vascular futuro dentre os 24,320 participantes do estudo Caucasiano que coletivamente experimentaram 825 casos de um primeiro evento de ponto final do compósito CVD total durante o período seguido até 10 anos (Tabela 2; idade ajustada HR 1,50, 95% CI: 1,09 – 2,05,  $p = 0,012$ ). Nenhum dos eventos ocorridos dentre os 15 veículos homozigotos do menor alelo consistentes com a taxa geral de incidência baixa, e, portanto, estes poucos indivíduos foram executados a partir de análise do risco de doença incidente futura. A magnitude do efeito de rs3798220 foi similar aos pontos de terminação específica de MI, acidente vascular cerebral isquêmico, e revascularização. Desse modo, para os pontos de terminação mais clinicamente relevantes de maiores eventos vasculares (MI não-fatal, acidente vascular cerebral isquêmico não-fatal, e morte cardiovascular), a razão de perigo ajustada à idade foi 1,58 (95% CI: 1,07 – 2,33,  $p = 0,021$ ). Estes efeitos permaneceram estatisticamente significantes após o ajuste para fatores de risco cardiovascular tradicional para que a razão de perigo totalmente ajustada para eventos totais vasculares foi de 1,50 (1,07 – 2,10,  $p = 0,009$ ), e a razão de perigo totalmente ajustada para o maior evento vascular foi de 1,54 (CI: 1,01 – 2,35,  $p = 0,043$ ). Dentre todos os riscos aumentados dentre heterozigotos foi limitado àqueles com níveis de Lp(a) elevados (Tabela 2). Por exemplo, para maiores eventos cardiovasculares, a razão de perigo ajustado à idade para os heterozigotos com Lp(a) alto [1,78 (CI: 1,26 – 2,51,  $p = 0,001$ )] foi maior e mais significante que para todos os heterozigotos, enquanto a razão de perigo para heterozigotos com baixo Lp(a) [0,84 (CI: 0,84 – 1,77,  $p = 0,65$ )] foi menor que e não estatisticamente diferentes do risco dentre os não-veículos (Tabela 2).

[000119] O risco aumentado de eventos cardiovasculares incidentes dentre heterozigotos Caucasianos de rs3798220 foi amplamente negado pela alocação para tratamento com baixa dose de aspirina (Figura 2). Especificamente, dentre os heterozigotos, a atribuição aleatória para aspirina foi associada com uma redução de 59 % em risco relativo de maiores eventos cardiovasculares (95 % CI: 0,81 – 0,10,  $p = 0,025$ ), enquanto que dentre alocação aleatória de não-veículos para aspirina não tiveram efeito significativo (redução relativa de risco de 9 %, 95 % CI: 0,023 a -0,09,  $p = 0,1$ ) (Figura 2A). Formalmente, esta interação de aspirina e genótipo foi significativa ( $p = 0,05$ , modelo ajustado à idade). Os efeitos diferenciais de aspirina dentre subgrupos de genótipos foram também observados para o ponto de terminação de MI e acidente vascular cerebral isquêmico (eventos clínicos associados à ruptura da placa e trombose oclusiva). Desse modo o efeito genético de rede para heterozigotos na ausência de aspirina foi uma duplicação aproximada do risco geral para maior incidente de eventos cardiovasculares combinados (HR ajustado à idade de 2,43, 95 % CI: 1,23 – 4,80,  $p = 0,01$ ) e acidente vascular cerebral isquêmico (HR ajustado à idade de 2,41, 95 % CI: 1,26 – 4,59,  $p = 0,008$ ) (Figura 2A-C). No entanto, o efeito da aspirina foi atenuado para o ponto de terminação da revascularização coronária (eventos clínicos associados à progressão da doença subjacente sem oclusão aguda; relativo risco relativo 36 %, 95 % CI: 0,89 a -0,44,  $p = 0,28$ ).

[000120] A interação de aspirina com o genótipo rs3798220 pareceu estar relacionada em parte a uma interação similar de aspirina com níveis elevados de Lp(a) em geral. Dentre os não-veículos Caucasianos do menor alelo de rs3798220, a aspirina reduziu o risco relativo de eventos dentre aqueles com níveis de Lp(a) acima de 90º percentual (65,1 mg/dL) enquanto que o efeito mínimo foi observado dentre aqueles com níveis de Lp(a) abaixo de 90º percentual (Figura 2D). Para o ponto terminal de revascularização, os efeitos da aspirina dentre Caucasianos com níveis de Lp(a) acima de 90º percentual (redução relativa de risco 39 %, 95 % CI: 0,64 –

0,05,  $p = 0,03$ ) foi comparável em magnitude ao efeito da aspirina dentre os heterozigotos Caucasianos.

[000121] A prevalência do menor alelo de rs3798220 marcadamente diferente entre Caucasianos (MAF = 1,9%) e WHS não-Caucasianos. Especificamente, a variação em rs3798220 foi quase ausente dentre America-Africanos auto-identificados (MAF = 0,5 %). Em contraste, o menor alelo foi mais prevalente que entre os Caucasianos para America-Asianos (MAF = 7,6%), Hispânicos (MAF = 15,1 %), e Americanos nativos (MAF = 9,1 %) (Tabela 3). As diferenças na frequência de alelos comparada com Caucasianos foram todas significantes, como foram diferentes entre America-Africanos e Hispânicos, America-Asianos, ou Americanos nativos e entre Hispânicos e Asianos. O projeto de genotipagem de Hapmapa detectou o menor alelo em Asianos (CHB + JPT, MAF = 5,6%), porém não em Caucasianos (CEU) ou Africanos (YRI) (37). A frequência entre Asianos do Hapmapa não foi significativamente diferente da frequência na subpopulação de America-Africanos ( $p = 0,59$ ). Dentre os Caucasianos, as diferenças regionais na frequência de alelo potencialmente relacionada aos graus de variação de mistura não poderia ser detectado pela classificação geográfica bruta através dos Estados Unidos. Em contraste ao encontrado em Caucasianos, os níveis de Lp(a) não foram elevados nem bimodais nas subpopulações de heterozigotos dos America-Asianos ou Hispânicos do WHS, ambos os quais tiveram números suficientes de participantes para avaliar a distribuição de Lp(a). Similarmente, não deveria parecer ser uma associação entre rs3798220 e incidentes de CVD nestas populações, embora a potência fosse limitada.

[000122] Neste estudo de grande escala de mulheres saudáveis inicialmente dos Estados Unidos, veículos Caucasianos do menor alelo do polimorfismo de rs3798220 no gene da apolipoproteína (a) (30) tiveram níveis amplamente elevados de Lp(a) bem como um dobro do risco de maiores eventos vasculares. No entanto, dentre os heterozigotos aleatoriamente alocados para aspirina de baixa dose, este

risco aumentado de eventos vasculares futuros foi eficazmente abolido (redução relativa do risco com aspirina 59 %,  $p = 0,025$ ). Dentre não-veículos, por contraste, houve evidencia mínima de um benefício a partir da terapia com aspirina (redução relativa de risco com aspirina 9 %,  $p = 0,31$ ). No contexto da atividade antitrombótica de aspirina, este resultado farmacogenético é consistente com a função direta de Lp(a) em trombose, talvez, através do domínio similar a protease de plasminogênio ou funções de ligação de lisina do domínio Kr como foi sugerido previamente (13, 38). A descoberta de que os efeitos de aspirina na associação de rs3798220 com infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral foram maiores que seus efeitos em revascularização coronária levanta a possibilidade intrigante que uma interação entre aspirina e derivado de Lp(a) de um alelo da apolipoproteína (a) específico pode ser mais relevante para ruptura de placas agudas e oclusão de vasos que a progressão da doença. Caso o efeito farmacogenético de rs3798220 também envolva possível redução dependente de alelo da expressão de apolipoproteína (a) através de aspirina continua desconhecida (39, 40). Ainda, estes dados provêm um método genético direto para definir subpopulações com mais ou menos benefícios de terapia de aspirina, um problema pertinente para a escolha controversa de aspirina ou alternativas de aspirina tais como tienopiridinas na prevenção e tratamento de doença vascular (31, 41, 42).

[000123] A base molecular da relação complexa entre a substituição não-sinônima codificada por rs3798220 e níveis de Lp(a) e risco cardiovascular irá requerer elucidação adicional. Em particular, os efeitos genéticos nos níveis e distribuição de Lp(a) os fazem difíceis de distinguir os efeitos no risco e a resposta de aspirina somente relacionada aos níveis elevados de Lp(a) provenientes dos efeitos relacionados à atividade biológica intrínseca transmitidos através da substituição de aminoácido, que pode também contribuir diretamente para Lp(a) elevado. Similarmente, relações entre o rs3798220 e haplotipos no locus da apolipoproteína (a)

não são claros, porém podem envolver ligação a um alto alelo de expressão do locus da apolipoproteína (a) em Caucasianos, por exemplo comum número não-usual de domínios tipo 2 de Kringle IV (43, 44). Esta hipótese deve explicar adicionalmente o padrão bimodal da distribuição de Lp(a), especialmente se o rs3798220 estiver ligado a dois ou mais haplotipos direcionando diferentes níveis de Lp(a).

[000124] A análise de frequência de alelo é consistente com pelo menos uma origem de rs3798220 na Ásia, porém não localiza a presença desta variante em Caucasianos. Dada a frequência moderada de rs3798220 nos Caucasianos e a falta de polarização regional aparente em sua distribuição através dos Estados Unidos, a mistura com populações America-Asianos parece uma explicação improvável. No entanto, enquanto a maioria da variação privada para populações não-Africanas pode ter aparecido através de processos estocásticos em vez de seleção positiva (45), a associação de rs3798220 com níveis de Lp(a) combinados com sua frequência significativamente diferente nos Caucasianos e outras populações não-Africanas levantam a possibilidade de que ambos a seleção e direção podem ser responsáveis por sua distribuição biogeográfica. Ambos estes processos são consistentes com o alto nível de variação genética específica de população e expressão no locus da apolipoproteína (a) bem como especulação a cerca da função de Lp(a) (3).

[000125] Além de fornecer pistas sobre as propriedades biológicas de Lp(a), as associações de rs3798220 com níveis de Lp(a), risco cardiovascular, e os efeitos do tratamento com aspirina ilustram o potencial de aproximações genéticas no entendimento comum de doenças complexas. A respeito disso, os resultados oferecem não somente uma estratégia farmacogenética para gerenciar um tipo específico de risco de CVD devido à variação genética, mas também a maior esperança de administrar a saúde com a precisão mais possível através da medicina personalizada com base no gene.

Referências:

1. S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, em Handbook of Lipoproteína testing N. Rifai, G. R. Warnick, M. H. Dominiczak, Eds. (AACC Press, Washington, D.C., 2000) pp. 819.
2. L. Berglund, R. Ramakrishnan, Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 2219 (2004).
3. H. H. Hobbs, A. L. White, Curr Opin Lipidol 10, 225 (1999).
4. J. Danesh, R. Collins, R. Peto, Circulation 102, 1082 (2000).
5. P. M. Ridker, J. E. Buring, N. Rifai, N. R. Cook, JAMA 297, 611 (2007).
6. J. Suk Danik, N. Rifai, J. E. Buring, P. M. Ridker, JAMA 296, 1363 (2006).
7. G. L. Cushing et al., Arteriosclerosis 9, 593 (1989).
8. F. Paultre et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 2619 (2000).
9. D. Baldassarre, E. Tremoli, G. Franceschini, S. Michelagnoli, C. R. Sirtori, Stroke 27, 1044 (1996).
10. F. Kronenberg et al., Circulation 100, 1154 (1999).
11. S. Tsimikas et al, N Engl J Med 353, 46 (2005).
12. M. B. Boffa, S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, Clin Biochem 37, 333 (2004).
13. M. A. Hancock, M. B. Boffa, S. M. Marcovina, M. E. Nesheim, M. L. Koschinsky, J Biol Chem 278, 23260 (2003).
14. N. M. Caplice et al, Blood 98, 2980 (2001).
15. R. Strater et al, Lancet 360, 1540 (2002).
16. E. Angles-Cano et al, Chem Phys Lipids 67 - 68, 369 (1994).
17. S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, Curr Opin Lipidol 14, 361 (2003).
18. B. R. Gabel, M. L. Koschinsky, Biochemistry 34, 15777 (1995).
19. U. Broeckel et al, Nat Genet 30, 210 (2002).
20. E. Boerwinkle et al, J Clin Invest 90, 52 (1992).

21. V. Mooser et al, Am J Hum Genet 61, 402 (1997).
22. K. Schmidt, H. G. Kraft, W. Parson, G. Utermann, Eur J Hum Genet 14, 190 (2006).
23. S. M. Marcovina, H. H. Hobbs, J. J. Albers, Clin Chem 42, 436 (1996).
24. S. M. Marcovina et al, Clin Chem 46, 1956 (2000).
25. S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, J. J. Albers, S. Skarlatos, Clin Chem 49, 1785 (2003).
26. O. Rosby, K. Berg, J Intern Med 247, 139 (2000).
27. K. Valenti, E. Aveyrier, S. Leaute, F. Laporte, A. J. Hadjian, Atherosclerosis 147, 17 (1999).
28. J. P. Chretien et al, J Med Genet 43, 917 (2006).
29. R. Redon et al., Nature 444, 444 (2006).
30. M. M. Luke et al., submitted (2007).
31. P. M. Ridker et al., N Engl J Med 352, 1293 (2005).
32. C. N. Rotimi et al, Genet Epidemiol 14, 157 (1997).
33. J. Rubin et al, J Lipid Res 43, 234 (2002).
34. M. Scholz et al, Eur J Hum Genet 7, 169 (1999) página 17
35. H. G. Kraft et al, Eur J Hum Genet 4, 74 (1996).
36. C. Sandholzer et al, Hum Genet 86, 607 (1991).
37. The International HapMap Consortium, Nature 426, 789 (2003).
38. M. A. Hancock, C. A. Spencer, M. L. Koschinsky, Biochemistry 43, 12237 (2004).
39. M. Akaike et al., Clin Chem 48, 1454 (2002).
40. A. Kagawa, H. Azuma, M. Akaike, Y. Kanagawa, T. Matsumoto, J Biol Chem 21 A, 341 11 (1999).
41. D. L. Bhatt et al., Am Heart J 150, 401 (2005).
42. M. A. Pfeffer, J. A. Jarcho, N Engl J Med 354, 1744 (2006).

43. D. Gavish, v. Azrolan, J. L. Breslow, J Clin Invest 84, 2021 (1989).

44. G. Utermann et al., J Clin Invest 80, 458 (1987).

45. D. A. Hinds et al, Science 307, 1072 (2005).

### *Materiais e Métodos*

[000126] Populações de estudo: a população de estudo primário derivada do Women's Health Study (WHS), um ensaio randomizado de aspirina (100 mg oralmente em dias alternados) e placebo na prevenção primária de doenças cardiovasculares conduzidas dentre mulheres inicialmente saudáveis com idade de pelo menos 45 no registro que foram acompanhadas por um período de 10 anos (1, 2). No registro, os participantes proveram informação demográfica e clínica de linha de base. 28,345 participantes de WHS proveram sangue para análise genético e de plasma. Dentre estas amostras, os níveis de Lp(a) da linha de base foram medidos com um ensaio turbidimétrico que não é afetado pelo número de domínios de Kr IV tipo - 2 repetidos no analisador Hitachi 917 (Roche Diagnostics, Indianapolis, ID) (3). A medida da linha de base de outras frações de lipídios, biomarcadores de inflamação, e outros componentes do plasma foram descritos anteriormente (4). O total de eventos cardiovasculares incidentes determinados durante o período de acompanhamento incluiu aqueles tipicamente associados com ruptura de placas e oclusão de vasos tais como infarto do miocárdio (MI), acidente vascular cerebral isquêmico, e morte cardiovascular, bem como aqueles tipicamente associados com progressão de doença aterosclerótica subjacente definida como revascularização por angioplastia coronária transluminal percutânea (PTCA) ou corrupção do desvio da artéria coronária (CABG). Os maiores incidentes de eventos cardiovasculares foram definidos como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, ou morte cardiovascular. Em adição, a associação entre o rs3798220 e os níveis de Lp(a) do plasma foi avaliada em um grupo independente de 1058 homens Caucasianos que participaram do Physicians Health Study (PHS) (5). Dentre estes participantes do PHS, níveis de Lp(a)

foram determinados com um método clínico padrão baseado em ELISA (6).

[000127] Genotipagem: Genótipos para rs3798220 nos participantes de WHS participantes foram determinados através de um procedimento de ligação de oligonucleotídeo que combinou amplificação PCR das sequências alvo de 3ng do DNA genômico com ligação subsequente de oligonucleotídeo de alelo específico (7). Os produtos de ligação dos dois alelos foram então separados por hibridização para oligonucleotídeos de produtos específicos, cada um acoplado às microesferas Luminex®100TM x MAP espectralmente distintas (Luminex, Austin, TX). Os produtos capturados foram rotulados fluorescentemente com streptavidin R- phycoerythrin (Prozyme, San Leandro, CA), classificados com base no espectro de microesfera, e detectados por um instrumento Luminex® 100TM (8). Os genótipos no rs3798220 no PHS foram determinados com um método de amplificação de DNA em tempo real, de alelo específico, baseado em fluorescência como descrito (ABI, Foster City) (9). Para as populações do WHS e PHS respectivamente, as frações de amostras com determinação bem-sucedida de genótipos foram de 96,3 % e 97,8 %. Das 27,289 mulheres com amostras de DNA para genotipagem, a verificação completa para o genótipo rs3798220, níveis de Lp(a), idade, e ocorrência de incidente de eventos cardiovasculares estiveram disponíveis para 25,436. Destes, 24,320 eram Caucasianos, 468 eram America-Africanos, 282 eram America-Asianos, 262 eram Hispânicos, 62 eram Americanos nativos, e 42 tinham ancestrais desconhecidos.

[000128] Métodos Estatísticos: Os desvios do equilíbrio de Hardy- Weinberg foram avaliados utilizando um teste de relação log-probabilidade. Diferenças em co-variantes clínicos dentre as três classes de genótipos foram avaliados através de procedimentos ANOVA para características distribuídas de forma normal, através do teste de Kruskal-Wallis para características distribuídas de forma não-normal, e através de um teste qui-quadrado de proporções para características categóricas. Similarmente, a significância de diferenças em frequências de alelo entre os pares de

populações com diferentes ancestrais biogeográficos foi determinada com um teste Qui-Quadrado. Para análise de desvio geográfico em níveis de Lp(a) e na frequência do menos alelo dos alelos de rs3798220, local de residência no registro foi classificado em um de seis grupos correspondentes ao Nordeste, Sul, Centro-Oeste, Sudoeste, zonas de montanha, e áreas do extremo oeste dos Estados Unidos. A significância destas atribuições em explicar níveis de Lp(a) ou frequência de alelo foi determinada com regressão logística ou análise qui-quadrática. A avaliação prospectiva da associação entre rs3798220 e o risco de CVD incidente foi desempenhada com modelos de riscos proporcionais de Cox ajustados por idade ou co-variantes de risco tradicionais (idade, pressão sanguínea, histórico de diabetes, status de fumo, histórico familiar de infarto do miocárdio, LDL-C, e HDL-C. Em todas as análises registradas, o pressuposto de proporcionalidade nos modelos de Cox não poderia ser rejeitado ( $p > 0,05$ ). As diferenças no risco associado com tratamento com aspirina foram determinadas incluindo um termo de interação nos modelos de Cox ou por análise que participantes estratificaram de acordo com sua atribuição para aspirina ou placebo.

[000129] O exame de níveis de Lp(a) dentre rs3798220 Caucasianos heterozigotos revelaram uma clara distribuição bimodal. Um subgrupo teve níveis de Lp(a) menores com uma distribuição aproximadamente log-normal que é também observada para não-veículos do menor alelo, enquanto o outro subgrupo teve maiores níveis de Lp(a) com uma distribuição aproximadamente normal. Por conseguinte, estes participantes foram classificados em subgrupos baixos ou altos de Lp(a) modelando a distribuição bimodal observada como uma mistura de log-normal independente [para Lp(a)] baixo e normal [para distribuições de Lp(a)] altas que foram ajustadas para valores de Lp(a) com um algoritmo máximo de expectativa (EM) (10). Um nível de Lp(a) de 27.9 mg/dL correspondente a um valor de responsabilidade de 0,5 no algoritmo EM foi utilizado para discriminar o grupo Lp(a) alto do grupo Lp(a) baixo. A classificação destes dois modelos de distribuição foi essencialmente ambígua

naquele de 806 atribuições fora de 887 (91 %) tiveram valores de responsabilidade que foram pelo menos 95 % de certeza.

Referências para Materiais e Métodos:

1. 1. M. Lee et al, JAMA 294, 56 (2005).
2. P. M. Ridker et al., N Engl J Med 352, 1293 (2005).
3. S. M. Marcovina et al., Clin Chem 46, 1956 (2000).
4. P. M. Ridker, N. Rifai, N. R. Cook, G. Bradwin, J. E. Buring, JAMA 294, 326 (2005).
5. R. Y. Zee, S. Cheng, H. H. Hegener, H. A. Erlich, P. M. Ridker, Stroke 37, 2007 (2006).
6. P. M. Ridker, C. H. Hennekens, M. J. Stampfer, JAMA 270, 2195 (1993).
7. F. Barany, Proc Natl Acad Sci U SA 88, 189 (1991).
8. S. A. Dunbar, Clin Chim Acta 363, 71 (2006).
9. J. B. de Kok, E. T. Wiegerinck, B. A. Giesendorf, D. W. Swinkels, Hum Mutat 19, 554 2002.
10. T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman, The elements of statistical learning (Springer- Verlag, New York, 2001), pp. 533.

Tabela 1. Perfil clínico de linha de base para participantes do WHS por genótipo

	Genótipo rs3798220			
	TT (N=24119)	TC (N=904)	CC (N=15)	p-valor
características clínicas				
idade (anos)	52 (48.0 - 59.0)	52.0 (48.0 - 58.0)	52 (49.5 - 55.0)	0.352
BMI (kg/m^2)	24.9 (22.5 - 28.3)	24.7 (22.4 - 28.3)	24.9 (22.1 - 28.9)	0.758
histórico de hipertensão (%)	5950 (24.7)	237 (26.2)	3 (20.0)	0.530
histórico familiar MI (%)	2801 (12.9)	127 (15.5)	2 (15.4)	0.077
fumo atual (%)	2795 (11.6)	109 (12.1)	2 (13.3)	0.912
diabetes (%)	614 (2.5)	22 (2.4)	0 (0.0)	0.944
HRT (%)	10472 (43.5)	419 (46.5)	9 (60.0)	0.100
menopausa (%)	13139 (54.6)	486 (53.8)	8 (53.3)	0.907
colesterol total de biomarcadores de lipídio (mg/dL)	208.0 (184.0 - 235.0)	215.0 (189.0 - 241.0)	229 (208.5 - 250.0)	0.00031 <sup>#</sup>
LDL-C (mg/dL)	121.3 (100.4 - 144.2)	126.5 (105.5 - 149.2)	137.6 (118.8 - 157.4)	0.00022 <sup>#</sup>
apolipoproteína B (mg/dL)	100.0 (83.8 - 121.3)	107.3 (87.1 - 125.1)	109.8 (100.4 - 127.0)	0.00001 <sup>#</sup>
HDL-C (mg/dL)	51.8 (43.1 - 62.2)	51.8 (43.5 - 62.4)	51.7 (46.0 - 66.8)	0.600
apolipoproteína AI (mg/dL)	148.9 (132.3 - 167.9)	148.2 (133.4 - 166.3)	145.2 (135.9 - 168.3)	0.983
triglicerídeos (mg/dL)	119 (84 - 176)	117.0 (83.0 - 177.2)	104 (90.0 - 149.0)	0.890
Lp(a) (mg/dL)	10.0 (4.2 - 28.5)	79.3 (13.7 - 102.1)	153.9 (105.6 - 215.0)	<<0.001 <sup>+</sup>
proteína C reativa de biomarcadores de inflamação (mg/L)	2.0 (0.8 - 4.4)	2.0 (0.8 - 4.2)	1.1 (0.9 - 2.4)	0.342
ICAM-1 solúvel (ng/ml)	342.9 (301.8 - 394.8)	343.8 (301.4 - 396.4)	349.4 (295.6 - 399.2)	0.961
fibrinogênio (mg/L)	349.9 (307.0 - 401.1)	348.9 (307.6 - 401.7)	343.5 (318.4 - 382.7)	0.851
outros biomarcadores				
creatinina (mg/dL)	0.7 (0.6 - 0.8)	0.7 (0.6 - 0.8)	0.7 (0.7 - 0.8)	0.402
homocisteína (umol/dL)	10.5 (8.7 - 12.9)	10.5 (8.7 - 12.8)	11.6 (8.6 - 12.7)	0.468
HbA1c (%)	5.0 (4.8 - 5.2)	5.0 (5.8 - 5.2)	4.9 (4.8 - 5.2)	0.658

\* Média (amplitudes interquartis para características quantitativas de N (%) para características discretas

<sup>+</sup> Analítico  $p=4.7 \times 10^{-11}$

<sup>#</sup> Não significante após ajuste para níveis Lp(a).

Tabela 2. Associação de rs3798220 com eventos cardiovasculares entre Caucasianos

	nts	HRCI)	p	genótipo rs3798220 e níveis de Lp(a)			
				Lp(a) alto		Lp(a)baixo	
				HRCI)	p	HRCI)	p
Incidente total de CVD	825	1.502.05)	0.012	1.782.51)	0.001	0.841.77)	0.650
Maior incidente de CVD	521	1.582.33)	0.021	1.852.83)	0.005	0.962.33)	0.930
Infarto do Miocárdio	211	1.572.88)	0.150	1.833.57)	0.076	0.953.83)	0.940
Derrame isquêmico	221	1.813.17)	0.039	2.013.79)	0.031	1.364.25)	0.600
Revascularização	475	1.432.18)	0.092	1.792.80)	0.011	0.621.93)	0.410

Modelos de risco proporcionais de Cox comparando heterozigotos aos homozigotos de referência para genótipos de alelos maiores (TT), incluindo ajustes por idade

Tabela 3. Frequência de alelo menor de rs3798220 em WHS e subpopulações de HapMap

grupo	N <sup>+</sup>	MAF	HWEp	Hisp.	A.Am	As	N.Am.	CHB+JPT	CEU	YRI
WHS Todos	26495	0.021	0.002	-	-	-	-	-	-	-
WHS Caucasianos	25038	0.019	0.048	<0.001	0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.002	0.002
WHS Hispânicos	275	0.151	0.901	-	<0.001	<0.001	0.017	0.005	0.000	0.000
WHS America-Africano	486	0.005	0.872	-	-	<0.001	0.001	<0.001	0.274	0.272
WHS Asiático	360	0.076	0.940	-	-	-	0.244	0.593	0.005	0.005
WHS Americano nativo	66	0.091	0.273	-	-	-	-	0.808	0.004	0.005
HapMap CHB+JPT	89	0.056	0.440	-	-	-	-	-	0.056	0.055
HapMap CEU	60	0.000	-	-	-	-	-	-	-	NA
HapMap YRI	60	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-

Número de indivíduos em cada subpopulação com genótipo bem-sucedido para rs3798220  
NA, não aplicável

[000130] Exemplo 2: Genotipagem de 40 SNPs adicionais em e próximo ao locus LPA nas amostras de WHS para determinar a variação de SNP no LD com rs3798220 em America-Europeus, America-Asianos, e Americanos Hispânicos.

[000131] Foram genotipados 40 SNPs adicionais no gene LPA (o gene para apolipoproteína (a)) e loci vizinhança em um indivíduo em um subconjunto de amostras provenientes do WHS escolhido nas bases de ambos os genótipos rs3798220 e ancestrais auto-registrados (America-Europeus (isto é, Branco ou Caucasiano), ou Americanos Hispânicos). Foi então estimado desequilíbrio de ligação (LD) entre estes novos SNPs e rs378220. Devido às amostras não terem sido escolhidas de forma aleatória, mas ao invés da base do genótipo rs3798220, não poderia simplesmente estimar a frequência de alelo e LD da amostra diretamente porém teve que inferir nas frequências do alelo e LD minimizando a diferença entre os genótipos observados e previstos dadas as estratégias de amostragem com base no rs379220. Os resultados mostraram que:

1) dois SNPs (rs9457931 dbSNP@NCBI (polimorfismo de nucleotídeo único na posição do cromossomo 6:160849894 NCBI construção 128) e rs9457927 dbSNP@NCBI (polimorfismo de nucleotídeo único na posição do cromossomo 6:160830272 NCBI construção 128)) foram quase completo em LD com rs3798220 entre os WHS Caucasianos (America-Europeus). Ambos os SNPs estão em genes LPAL2 vizinhos (Lipoproteína, Lp(a)-tipo 2 gene precursor, adjacente ao gene para apoLipoproteína (a));

2) outros SNPs tiveram uma faixa de LD para rs3798220; e

3) houve um padrão muito diferente de LD nas subpopulações de não-europeus. Estes resultados foram interpretados para sugerir que os efeitos descritos no Exemplo 1 fossem relacionados a um alelo carregando todos os três SNPs (rs3798220, rs9457931, rs9457927).

[000132] Exemplo 3: A relação entre o genótipo rs3798220, número de repetições de Kringle IV tipo 2 e expressão de Lp(a) nos três subgrupos de Dallas Heart Study com ancestrais distintos.

[000133] Foram genotipados os rs3798220 em Dallas Heart Study (DHS) (The American Journal of Cardiology Volume 93, Issue 12, 15 June 2004, Pages 1473-1480 ) para o qual o número de repetições de Kr IV, tipo 2 (KrIV2r's) no componente da apolipoproteína (a) da Lp(a) do plasma (isto é, proteína apo(a) expressa) foi determinada anteriormente (Circulation. 2005 ;111 :1471 - 1479). Esta população inclui homens e mulheres, dentre Brancos não-Hispânicos (ancestrais Europeus), Negros (ancestrais Africanos), e Hispânicos, totalizando 3529 amostras. A análise buscou identificar a correspondência entre o menor alelo de rs3798220 e o número de KrIV2r's expressos com possível dependência nos ancestrais. A análise foi desempenhada de duas maneiras. Primeiramente, todos os indivíduos foram considerados, e cada alelo KrIV2r do indivíduo (no nível do DNA) foi assumido para ser equivalente aos alelos expressos (no nível da proteína). Isto é, indivíduos com somente um KrIV2r expresso foi assumido para ter duas cópias daquele alelo no locus LPA (3529 indivíduos). Em segundo, foi considerado somente indivíduos com dois alelos de KrIV2r distintos (total de 2859), excluindo 668 com somente um alelo KrIV2r expresse a partir da análise. As conclusões foram muito similares para ambos. A saber, 1) entre brancos não-hispânicos, o menor alelo de rs3798220 foi fortemente correlacionado com 17 KrIV2r's e a um menor grau de 16 ou 18 repetições (embora a diferença entre 16, 17 e 18 repetições poderiam relacionar à resolução do ensaio para o número de KrIV2r) (Figura 3); 2) entre brancos não-hispânicos, alelos com um

número menor de KrlV2r geralmente expressa níveis maiores de Lp(a) (Figura 4); 3) brancos não-hispânicos expressando 17 KrlV2r's possuem níveis altos de Lp(a), indivíduos que, em adição, também carregam uma cópia do menor alelo de rs3798220 possuem níveis mesmo significativamente maiores de Lp(a) (pagina 11, direita inferior) (Figura 5); e 4) a distribuição de KrlV2r's, sua correlação com o nível de expressão, e sua correlação com rs3798220 é diferente nos grupos de ancestrais diferentes para que a correlação de rs3798220 e níveis extremos de Lp(a) observou brancos não-hispanicos não estão nos grupos dos outros ancestrais.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* para avaliar uma responsividade de um indivíduo humano ao tratamento com ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) determinar a identidade de um polimorfismo de nucleotídeo único na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene da apolipoproteína (a) (Apo(a)) do indivíduo humano, e

(b) detectar uma citosina ou guanina na dita posição do cromossomo 6:160880877,

em que a presença de um polimorfismo definido por citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 indica responsividade a ácido acetilsalicílico, e

em que o método é realizado *in vitro* em uma amostra de ácido nucleico do indivíduo.

2. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda determinar o nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) em uma amostra de sangue do indivíduo.

3. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo possui um nível elevado de Lp(a) no sangue,

em que o nível elevado de Lp(a) é de 10 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, 15 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, 20 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, ou 25 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo.

4. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a identidade do polimorfismo é determinada colocando um ácido nucléico obtido do indivíduo em contato com uma sonda de ácido nucléico.

5. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo

fato de que a identidade do polimorfismo é determinada por hibridização da sonda de alelo específico, extensão do iniciador de alelo específico, amplificação de alelo específico, digestão de 5' nuclease, ensaio de sinalizador molecular, ensaio de ligação oligonucleotídica, ou polimorfismo de conformação de filamento único.

6. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a identidade do polimorfismo é determinada sequenciando um ácido nucléico obtido do indivíduo.

7. Método *in vitro* para avaliar uma responsividade de um indivíduo humano ao tratamento com ácido acetilsalicílico para reduzir o risco de um evento cardiovascular futuro **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) determinar a identidade de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene da apolipoproteína (a) (Apo(a)) do indivíduo humano, em que a presença de um polimorfismo definido por citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 indica responsividade a ácido acetilsalicílico, e;

(b) detectar a presença ou ausência de um marcador genético ligado ou em desequilíbrio de ligação ao mesmo, em que o marcador genético é um SNP na posição do cromossomo 6:160849894 (NCBI construção 128; rs9457931 dbSNP@NCBI), ou em que o marcador genético é um SNP na posição do cromossomo 6:160830272 (NCBI construção 128; rs9457927 dbSNP@NCBI), ou em que a ligação está entre 16, 17, ou 18 repetições do domínio tipo 2 de Kringle (Kr) IV,

em que o método é realizado *in vitro* em uma amostra de ácido nucleico do indivíduo.

8. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 1 ou 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a presença de um polimorfismo definido por timina ou adenina na posição do cromossomo 6:160880877 indica não responsividade a ácido

acetilsalicílico.

9. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda determinar o nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) em uma amostra de sangue do indivíduo.

10. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o marcador genético é um alelo, um SNP, um polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), um DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD), um polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP), ou uma sequência simples repetida (SSR).

11. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo humano é identificado por ter também um nível elevado de Lipoproteína (a) (Lp(a)) no sangue,

em que o nível elevado de Lp(a) é de 10 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, 15 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, 20 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, ou 25 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo.

12. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 1 ou 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o evento cardiovascular é infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, síndrome coronariana aguda, isquemia do miocárdio, angina de peito estável crônica, angina de peito instável, morte cardiovascular, reestenose coronária, reestenose do stent coronário, re-trombose do stent coronário, revascularização, angioplastia, ataque isquêmico transitório, embolismo pulmonar, oclusão vascular, ou trombose venosa.

13. Método *in vitro* para avaliar um risco do indivíduo humano de um evento cardiovascular futuro **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) determinar a identidade de um polimorfismo de nucleotídeo único na posição do cromossomo 6:160880877 (Montagem de Março de 2006 - NCBI

construção 36.1; rs3798220 dbSNP @ NCBI) do gene da apolipoproteína (a) do indivíduo humano, e

(b) determinar o nível de Lipoproteína (a) (Lp(a)) em uma amostra de sangue do indivíduo humano,

em que a presença de um polimorfismo definido por citosina ou guanina na posição do cromossomo 6:160880877 e a presença de um nível elevado de Lp(a) na amostra de sangue do indivíduo indica que o indivíduo está em um risco elevado de um evento cardiovascular futuro,

em que o nível elevado de Lp(a) é de 10 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, 15 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, 20 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, ou 25 mg/dl ou maior na amostra de sangue do indivíduo, e

em que o método é realizado *in vitro* em uma amostra de ácido nucleico do indivíduo.

14. Método *in vitro*, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o evento cardiovascular é infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, morte cardiovascular, reestenose coronária, reestenose do stent coronário, re-trombose do stent coronário, revascularização, embolismo pulmonar, ou trombose venosa.

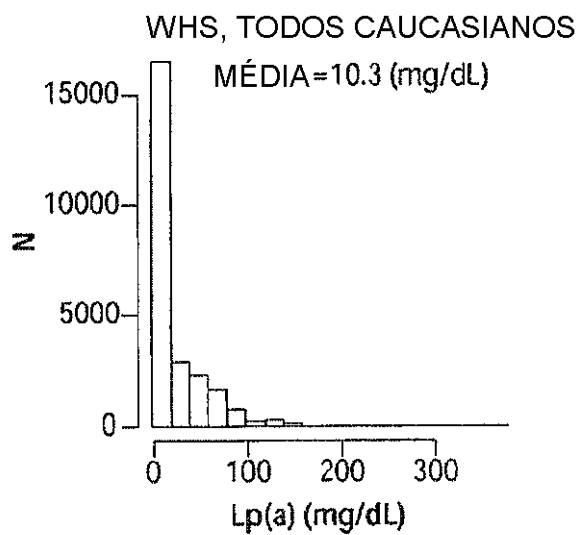


Fig. 1A

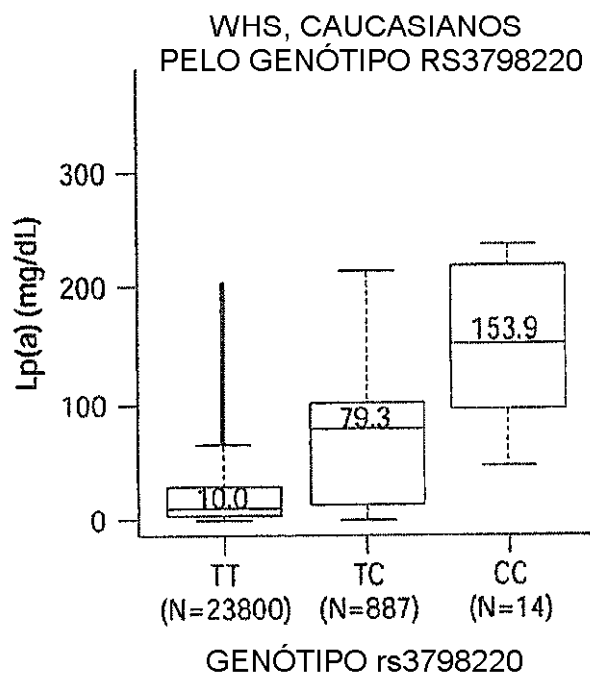


Fig. 1B

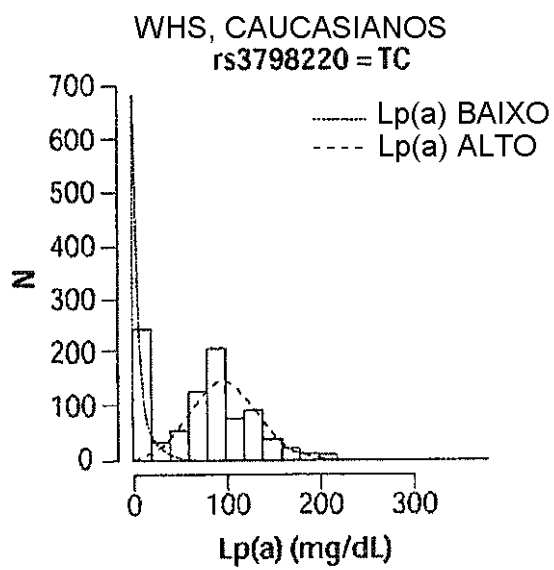


Fig. 1C

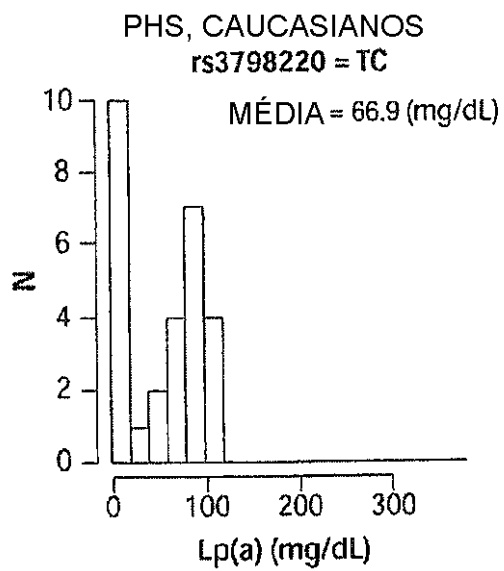
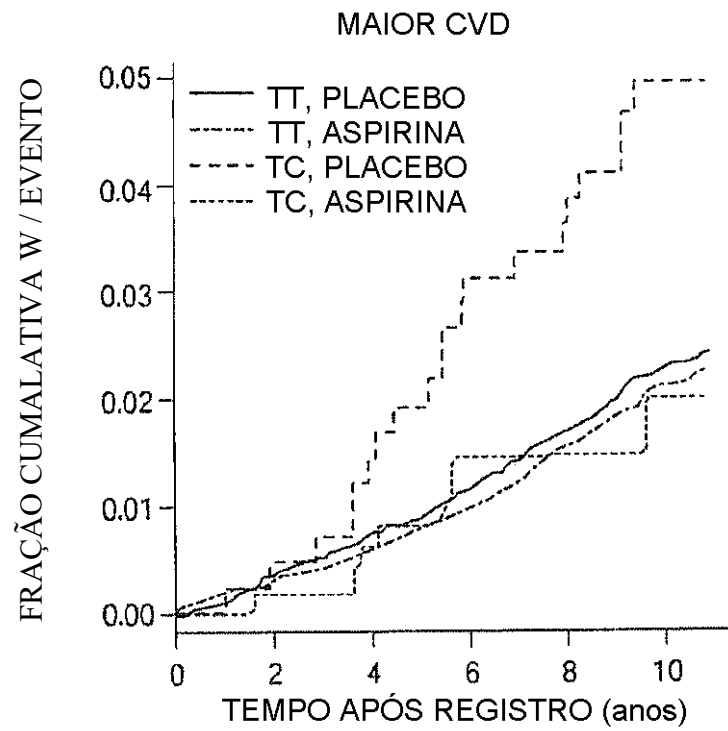
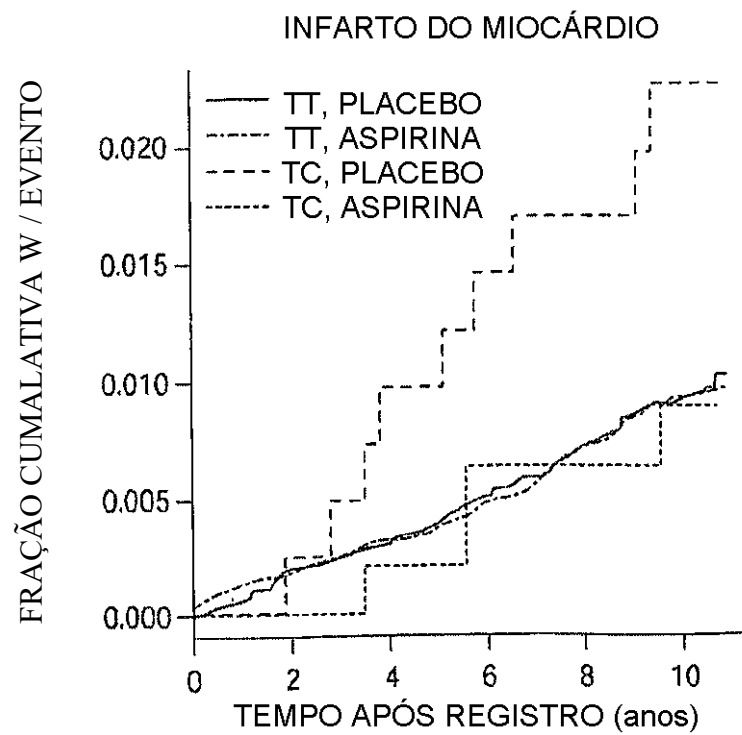


Fig. 1D

**Fig. 2A****Fig. 2B**

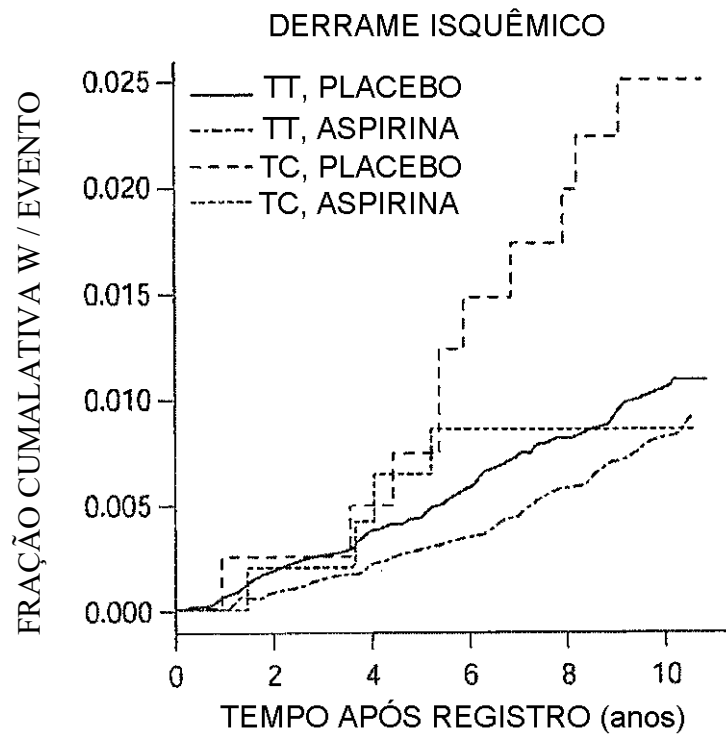


Fig. 2C

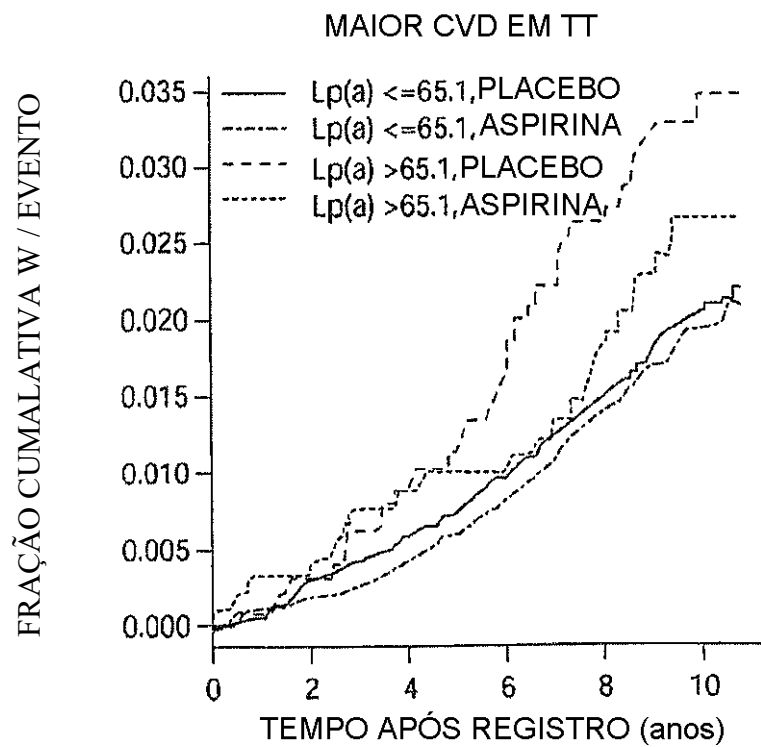


Fig. 2D

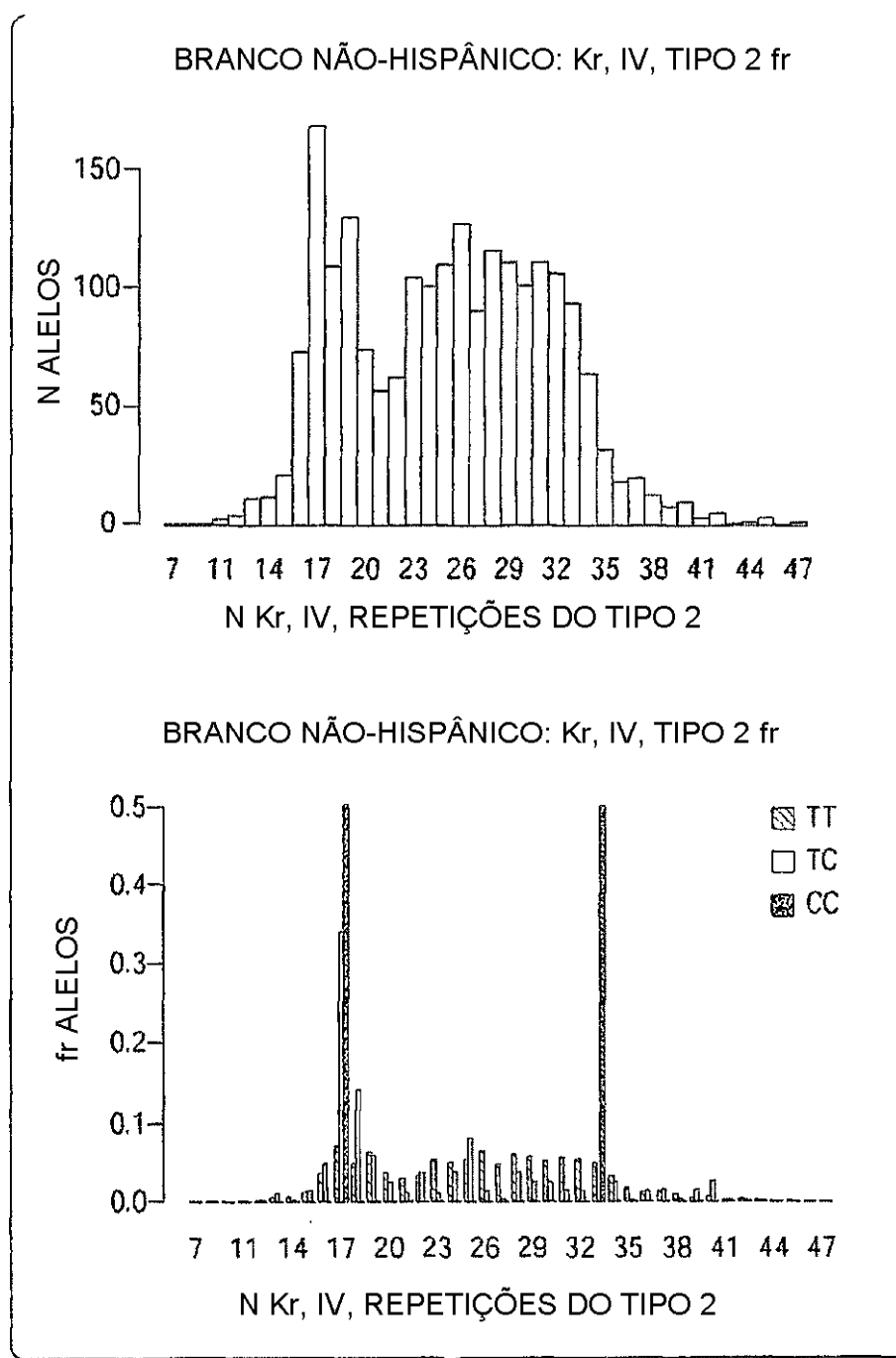


Fig. 3-1

## BRANCO NÃO-HISPÂNICO: Kr, IV, TIPO 2 N

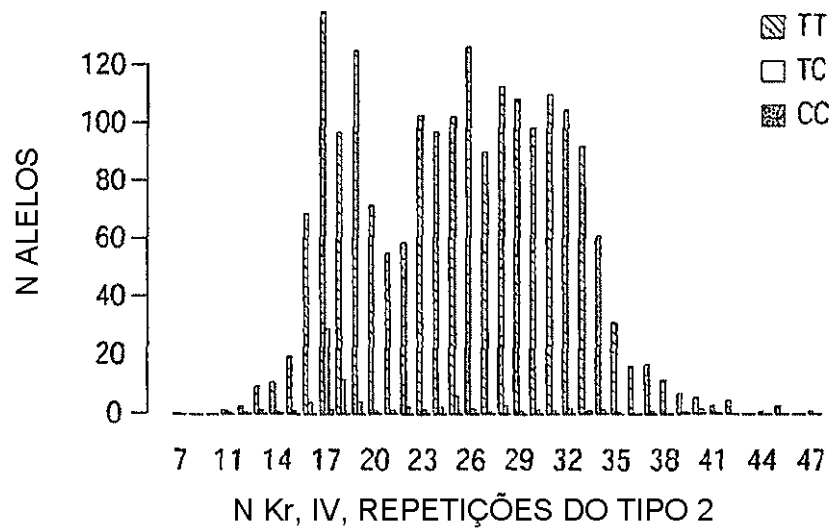


Fig. 3-2

## BRANCO NÃO-HISPÂNICO

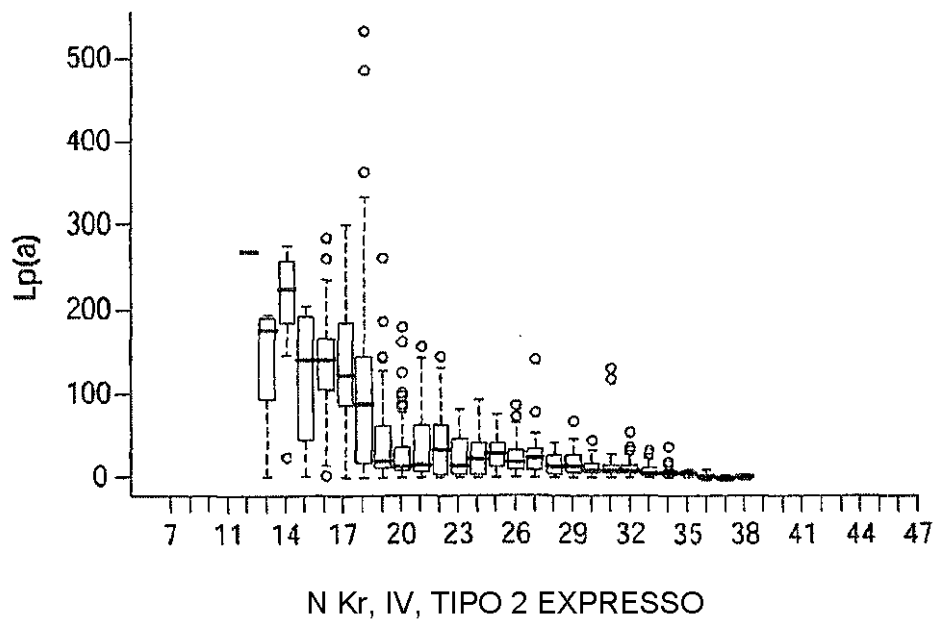


Fig. 4

Lp(a) PARA K<sub>r</sub>IV, TIPO 2 = 17 EXPRESSO NO  
BRANCO NÃO-HISPÂNICO  $p = 1,2e-05$

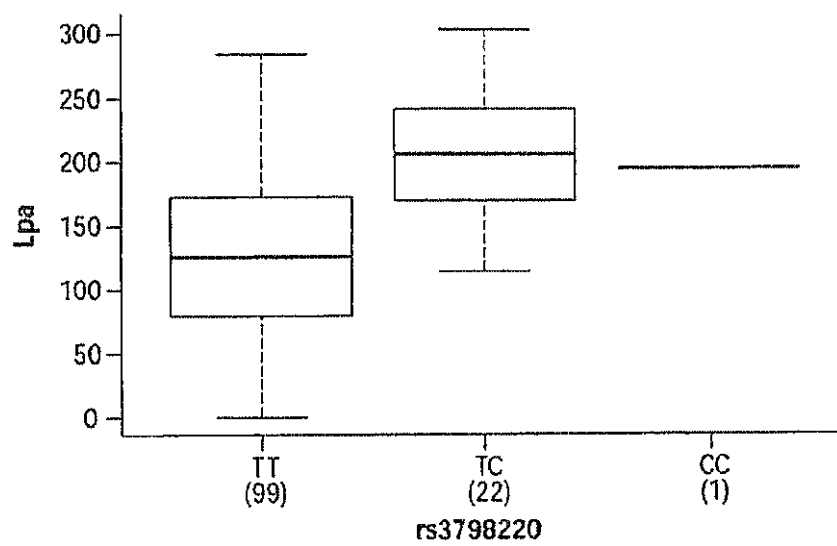


Fig. 5