

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.12.21	(73) Titular(es): ACADEMIA SINICA 128 SEC. 2, ACADEMIA SINICA ROAD NAN- KANG, TAIPEI TW
(30) Prioridade(s): 2004.12.21 US 638837 P 2005.05.10 US 679694 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.09.12	(72) Inventor(es): YUAN-TSONG CHEN HSIANG-YU YUAN JIN-JER CHEN TW TW TW
(45) Data e BPI da concessão: 2010.06.09 176/2010	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VARIANTE GENÉTICA DE VKORC1 PARA PREVER A SENSIBILIDADE À VARFARINA**

(57) Resumo:

DESCOBRIU-SE QUE HÁ UM POLIMORFISMO NO PROMOTOR DO GENE VKORC1 QUE ESTÁ ASSOCIADO À SENSIBILIDADE À VARFARINA. ESTE POLIMORFISMO PERMITE EXPLICAR AS DIFERENÇAS, QUER INTERINDIVIDUAIS QUER INTERÉTNICAS, DAS NECESSIDADES DE DOSAGEM COM VARFARINA. ALÉM DISSO, O POLIMORFISMO TAMBÉM ESTÁ ASSOCIADO À ACTIVIDADE DO PROMOTOR. ASSIM, A SEQUÊNCIA DO PROMOTOR OU A ACTIVIDADE DO GENE VKORC1 DE UM INDIVÍDUO PODE SERVIR PARA SE PREVER QUE QUANTIDADE DE VARFARINA DEVE SER PRESCRITA AO PACIENTE. SÃO APRESENTADOS MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELEVANTES.

RESUMO**"VARIANTE GENÉTICA DE VKORC1 PARA PREVER A SENSIBILIDADE À
VARFARINA"**

Descobriu-se que há um polimorfismo no promotor do gene VKORC1 que está associado à sensibilidade à varfarina. Este polimorfismo permite explicar as diferenças, quer interindividuais quer interétnicas, das necessidades de dosagem com varfarina. Além disso, o polimorfismo também está associado à actividade do promotor. Assim, a sequência do promotor ou a actividade do gene VKORC1 de um indivíduo pode servir para se prever que quantidade de varfarina deve ser prescrita ao paciente. São apresentados métodos e composições relevantes.

DESCRIÇÃO

"VARIANTE GENÉTICA DE VKORC1 PARA PREVER A SENSIBILIDADE À VARFARINA"

CAMPO DE INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a processos de dosagem de fármacos, em particular a varfarina.

REFERÊNCIAS

1. Hirsh, J. (1992) Antithrombotic therapy in deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Am. Heart J., 123, 1115-1122.
2. Laupacis, A., Albers, G., Dalen, J., Dunn, M., Feinberg, W. E Jacobson, A. (1995) Antithrombotic therapy in atrial fibrillation. Chest, 108, 352S-359S.
3. Stein, P.D., Alpert, J.S., Copeland, J., Dalen, J.E., Goldman, S. e Turpie, A.G. (1995) Antithrombotic therapy in patients with mechanical and biological prosthetic heart valves. Chest, 108, 371S-379S.
4. Hirsh, J., Dalen, J., Anderson, D.R., Poller, L., Bussey, H., Ansell, J. e Deykin, D. (2001) Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. Chest, 119, 8S-21 S.
5. Loebstein, R., Yonath, H., Peleg, D., Almog, S., Rotenberg, M., Lubetsky, A., Roitelman, J., Harats, D., Halkin, H. e Ezra, D. (2001) Interindividual variability in sensitivity to warfarin-Nature or nurture? Clin. Pharmacol. Ther., 70, 159-164.

6. Takahashi, H., Wilkinson, G.R., Caraco, Y., Muszkat, M., Kim, R.B., Kashima, T., Kimura, S. e Echizen, H. (2003) Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 73, 253-263.
7. Zhao, F., Loke, C., Rankin, S.C., Guo, J.Y., Lee, H.S., Wu, T.S., Tan, T., Liu, T.C., Lu, W.L., Lim, Y.T. et al. (2004) Novel CYP2C9 genetic variants in Asian subjects and their influence on maintenance warfarin dose. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 76, 210-219.
8. Yu, H.C., Chan, T.Y., Critchley, J.A. e Woo, K.S. (1996) Factors determining the maintenance dose of warfarin in Chinese patients. *QJM* 89, 127-135.
9. Xie, H.G., Kim, R.B., Wood, A.J. e Stein, C.M. (2001) Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41, 815-850.
10. Bogousslavsky, J. and Regli, F. (1985) Anticoagulant-induced intracerebral bleeding in brain ischemia. Evaluation in 200 patients with TIAs, emboli from the heart, and progressing stroke. *Acta. Neurol. Scand.*, 71, 464-471.
11. Landefeld, C.S. e Beyth, R.J. (1993) Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am. J. Med.*, 95, 315-328.
12. Gullov, A.L., Koefoed, B.G. e Petersen, P. (1994) Bleeding Complications to Long-Term Oral Anticoagulant Therapy. *J. Thromb. Thrombolysis*, 1, 17-25.
13. Kaminsky, L.S., Dunbar, D.A., Wang, P.P., Beaune, P., Larrey, D., Guengerich, F.P., Schnellmann, R.G. e Sipes, I.G. (1984) Human hepatic cytochrome P-450 composition as

probed by in vitro microsomal metabolism of warfarin. *Drug Metab. Dispos.*, 12, 470-477.

14. Rettie, A.E., Korzekwa, K.R., Kunze, K.L., Lawrence, R.F., Eddy, A.C., Aoyama, T., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J. e Trager, W.F. (1992) Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-450C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 54-59.

15. Kaminsky, L.S., de Morais, S.M., Faletto, M.B., Dunbar, D.A. e Goldstein, J.A. (1993) Correlation of human cytochrome P450C9 substrate specificities with primary structure: warfarin as a probe. *Mol. Pharmacol.*, 43, 234-239.

16. Xie, H.G., Prasad, H.C., Kim, R.B. e Stein, C.M. (2002) CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 54, 1257-1270.

17. Kirchheiner, J. e Brockmoller, J. (2005) Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 77, 1-16.

18. Furuya, H., Fernandez-Salguero, P., Gregory, W., Taber, H., Steward, A., Gonzalez, F.J. e Idle, J.R. (1995) Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics*, 5, 389-392.

19. Aithal, G.P., Day, C.P., Kesteven, P.J. e Daly, A.K. (1999) Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 353, 717-719.

20. Higashi, M.K., Veenstra, D.L., Kondo, L.M., Wittkowsky, A.K., Srinouanprachanh, S.L., Farin, F.M. e Rettie, A.E. (2002) Association between CYP2C9 genetic variants and

anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA*, 287, 1690-1698.

21. Nasu, K., Kubota, T. e Ishizaki, T. (1997) Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics*, 7, 405-409.

22. Bell, R.G. e Matschiner, J.T. (1972) Warfarin and the inhibition of vitamin K activity by an oxide metabolite. *Nature*, 237, 32-33.

23. Wallin, R. e Martin, L.F. (1985) Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J. Clin. Invest.*, 76, 1879-1884.

24. Li, T., Chang, C.Y., Jin, D.Y., Lin, P.J., Khvorova, A. e Stafford, D.W. (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 427, 541-544.

25. Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hortnagel, K., Pelz, H.J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G. et al. (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427, 537-541.

26. Harrington, D.J., Underwood, S., Morse, C., Shearer, M.J., Tuddenham, E.G. e Mumford, A.D. (2005) Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb. Haemost.*, 93, 23-26.

27. D'Andrea, G., D'Ambrosio, R.L., Di Perna, P., Chetta, M., Santacroce, R., Brancaccio, V., Grandone, E. e Margaglione, M. (2005) A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*, 105, 645-649.

28. Massari, M.E. e Murre, C. (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.*, 20, 429-440.
29. Terai, S., Aoki, H., Ashida, K. e Thorgeirsson, S.S. (2000) Human homologue of maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. *Hepatology*, 32, 357-366.
30. Bodin, L., Verstuyft, C., Tregouet, D.A., Robert, A., Dubert, L., Funck-Brentano, C., Jaillon, P., Beaune, P., Laurent-Puig, P., Becquemont, L. et al. (2005) Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood*, 106(1):135-140.
31. Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J. e Tjian, R. (1987) A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell*, 48, 79-89.
32. Rieder, M. J., A. P. Reiner, et al. (2005). Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.* 352(22): 2285-93.
33. Geisen, C., M. Watzka, et al. (2005). VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and interethnical variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost*, 94(4): 773-9.
34. Veenstra, D. L., J. H. You, et al. (2005). Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics*, 15(10): 687-91.
35. Sconce, E. A., T. I. Khan, et al. (2005). The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient

characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*, 106(7): 2329-33.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A varfarina é um anticoagulante vulgarmente prescrito para a prevenção de doenças tromboembólicas em pacientes com trombose das veias profundas, fibrilhação arterial ou em casos de substituição de válvulas cardíacas mecânicas (1-4). No entanto, o tratamento com varfarina é problemático, uma vez que a dose necessária de varfarina é muitíssimo variável, tanto interindividualmente como interetnicamente (5-7). De um modo geral, as populações asiáticas, incluindo os chineses, necessitam de uma dose de manutenção muito menor do que os caucasianos e hispânicos (6-9). As hemorragias são, de longe, a complicação mais grave do tratamento com varfarina (10-142). Têm sido efectuados muitos esforços para monitorizar a segurança deste anticoagulante oral. Presentemente, a dose tem de ser monitorizada rigorosamente por determinações sequenciais do tempo de protrombina do sangue, recorrendo-se ao uso do índice internacional normalizado (INR).

O citocromo P450, subfamília IIC, polipeptido 9 (CYP2C9) é o principal fármaco que metaboliza a enzima que catalisa a hidroxilação da varfarina (13-15). O CYP2C9*2 e o CYP2C9*3 são os polimorfismos mais frequentemente encontrados na população caucasiana. Tomando o CYP2C9*1 como tipo selvagem, as frequências haplotípicas para CYP2C9*1/*2 e CYP2C9*1/*3 são respectivamente ~ 20% e ~12% (16, 17). Comprovou-se que as variantes CYP2C9*2 e CYP2C9*3 fazem diminuir a actividade enzimática de CYP2C9, o que determina sensibilidade à varfarina e, em casos graves,

complicações hemorrágicas (18-20). No entanto, tanto o CYP2C9*2 como o CYP2C9*3 estão totalmente ausentes ou são raros nas populações asiáticas (9,21). As variantes genéticas até agora encontradas em CYP2C9 apenas permitem explicar parcialmente algumas das diferenças interindividuais nas dosagens com varfarina, mas não conseguem explicar as diferenças interétnicas (6, 7,16).

A γ -carboxilação dos factores de coagulação dependentes da vitamina K (factor II, VII, IX e X) é essencial para a coagulação do sangue. A γ -carboxilase utiliza a forma reduzida da vitamina K e o oxigénio para acrescentar uma molécula de dióxido de carbono à cadeia lateral do ácido glutâmico nos factores de coagulação. Durante a carboxilação, a vitamina K reduzida é oxidada para originar 2,3-epóxido de vitamina K, a partir do qual a vitamina K reduzida é regenerada pela epóxido redutase da vitamina K, para um outro ciclo de catálise. A varfarina bloqueia a síntese dos factores de coagulação ao inibir a redutase do epóxido de vitamina K (22, 23). Recentemente foi clonado (24, 25) o gene que codifica o complexo de epóxido redutase de vitamina K, a subunidade 1 (VKORC1) e foram encontradas mutações do gene VKORC1 em pacientes resistentes à varfarina (25, 26). Também se concluiu que há um polimorfismo intrónico associado com alguma variabilidade interindividual da varfarina, em pacientes italianos (27).

Estes estudos não conseguem explicar toda a variabilidade da dosagem com varfarina, em particular as variações interétnicas. Por outro lado, há uma grande parte da população mundial, os asiáticos, não abrangida. Assim sendo, é desejável encontrar um processo para prever o

intervalo adequado de dosagem com varfarina, que possa ser aplicado mais generalizadamente.

A sequência do gene VKORC1, que compreende o polimorfismo promotor na posição 1639, está disponível com o número AY587020 de acesso em EMBL.

O documento WO 2006/044686 descreve processos para a previsão de respostas aos fármacos. Em particular, descreve processos para a determinação das dosagens de varfarina, com base na presença ou na ausência de polimorfismos no gene VKORC1. O documento WO 2006/044686 indica que um paciente portador do clado homozigótico A/A ou B/B é, respectivamente, sensível ou resistente à varfarina. Os clados baseiam-se num número de haplotipos que se referem a uma combinação particular de dez polimorfismos nucleotídicos pontuais localizados no gene VKORC1.

O documento WO2005030039 descreve uma ligação entre a dosagem de varfarina e os SNP nas posições 6853 e 9041 da SEQ ID NO: 1.

DESCRIÇÃO ABREVIADA

Neste estudo concluiu-se que há um polimorfismo no promotor do gene VKORC1 que está associado à sensibilidade à varfarina. Este polimorfismo consegue explicar tanto as diferenças interindividuais como as diferenças interétnicas em termos de exigências de dosagem com varfarina. Por outro lado, o polimorfismo também está associado à actividade do promotor. O promotor VKORC1 que possui um resíduo G na posição -1639 (numeração feita relativamente ao primeiro nucleótido do códon de iniciação) é 44% mais activo do que o promotor que possui um resíduo A na mesma posição. Os

pacientes com o polimorfismo -1639 A são mais sensíveis à varfarina. Os pacientes homozigóticos AA na posição -1639 são os que necessitam das doses mais pequenas, os pacientes heterozigóticos AG necessitam de doses intermédias e os pacientes homozigóticos GG necessitam das posologias mais elevadas. Assim, a sequência do promotor ou a actividade do gene VKORC1 de um paciente podem servir para se prever a quantidade de varfarina que deve ser prescrita a um paciente. Este método melhora, significativamente, a exactidão das prescrições de doses de varfarina. Presentemente, administra-se aos pacientes uma dose inicial, sendo o seu INR monitorizado periodicamente, e depois faz-se o ajustamento das doses de varfarina de acordo com os resultados, até se obter uma dose de manutenção que seja segura para o paciente. De acordo com a presente invenção, a dose prevista irá ser muito mais próxima da dose de manutenção, pelo que a dosagem com varfarina irá ser mais rápida, mais segura e mais económica.

Posto isto, de acordo com um dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um processo para prever o intervalo de dosagem de varfarina para um ser humano, o qual compreende os passos seguintes: investigar o nucleótido da posição -3673 da SEQ ID NO: 1 do paciente; determinar se o paciente é sensível ou resistente à varfarina, com base no nucleótido da posição -3673, em que os grupos homozigótico AA, heterozigótico AG e homozigótico GG na posição 3673 indicam se o paciente é, respectivamente, sensível, medianamente sensível ou resistente à varfarina; e prever um intervalo de dosagem de varfarina com base na sensibilidade ou na resistência do paciente à varfarina.

Quanto mais sensível for o paciente à varfarina, tanto mais elevado é o risco de haver complicações subsequentes, tais como hemorragias.

Em particular investiga-se a sequência na posição -1639 do gene VKORC1. Se o nucleótido nesta posição for um A, o paciente é muito sensível à varfarina. Assim sendo, um paciente que possua o grupo homozigótico AA na posição -1639 do gene VKORC1 é mais sensível do que um paciente heterozigótico que possua um nucleótido A e um outro nucleótido (G, C ou T) nessa posição. Por sua vez, o mesmo paciente heterozigótico é mais sensível à varfarina do que um indivíduo que não tenha nenhum A nessa posição.

A sequência pode ser investigada testando um marcador genético equivalente de -1639 A ou do alelo -1639G/C/T, em que a presença do marcador genético equivalente é um sinal indicador da presença do alelo correspondente. Por exemplo, o marcador genético equivalente por ser um SNP seleccionado entre o conjunto constituído por rs9934438, rs8050894, rs2359612 e rs7294 do gene VKORC1, sendo cada um deles indicador de resistência à varfarina.

Em algumas variantes da presente invenção, investiga-se a sequência utilizando um oligonucleótido que hibrida especificamente com o promotor do gene VKORC1. De preferência, o oligonucleótido hibrida especificamente pelo menos com 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24 nucleótidos que abrangem a posição -1639 do gene VKORC1. A sequência pode ser investigada utilizando ADN preparado a partir do sangue periférico do paciente.

O paciente da presente invenção é, preferencialmente, asiático, caucasiano, africano, afroamericano ou hispânico.

É possível combinar outros métodos, para determinação das doses de varfarina, com a investigação do gene VKORC1. Por exemplo, também é possível investigar a sequência do gene de CYP2C9 com base em metodologias conhecidas na especialidade. Por exemplo, ambos os CYP2C9*2 e CYP2C9*3 estão associados à sensibilidade à varfarina.

A presente invenção pode ser levada à prática utilizando um estojo para determinação do intervalo de dosagem de varfarina, o qual contém pelo menos um componente seleccionado entre o conjunto constituído por:

- (a) um sistema para detectar a sequência A na posição -1639 do gene VKORC1; e
- (b) um sistema para detectar a sequência G na posição -1639 do gene VKORC1.

O estojo pode conter também um sistema para detectar as sequências C e T da posição -1639 do gene VKORC1. Assim, em alguns casos, o estojo pode conter um sistema para detectar cada uma das quatro bases possíveis nessa posição. Noutros casos, o estojo pode conter um sistema para detectar A e um sistema para detectar G, C ou T nessa posição, uma vez que a presença de A nessa posição é o melhor indicador de sensibilidade à varfarina. De preferência, o sistema é um oligonucleótido. O estojo pode conter, facultativamente, os reagentes para a hibridação do oligonucleótido, para amplificação por PCR e/ou instruções de utilização.

O oligonucleótido, ou o seu complemento, hibrida com uma região do promotor do gene VKORC1, em que a região abrange a posição -1639 do promotor e é constituída pelo menos por 6 nucleótidos. De preferência, o oligonucleótido hibrida especificamente pelo menos com 6, 8, 10, 12, 14, 16,

18, 20, 22 ou 24 nucleótidos que abrangem a posição -1639 do gene VKORC1. O oligonucleótido consegue hibridar com esta região em que o nucleótido na posição -1639 é A, G C ou T, de preferência A ou G. Em alguns casos, o oligonucleótido pode ser constituído por cerca de 15 nucleótidos ou menos, 16-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos, 25-30 nucleótidos ou 30-40 nucleótidos. Também é possível prever um sistema que compreenda o oligonucleótido da presente invenção.

Os pormenores de uma ou várias variantes da presente invenção são explicitados adiante nos desenhos anexos e na memória descritiva subsequente. Outras particularidades, objectivos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição, dos desenhos e das reivindicações anexas.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Gráfico de dispersão de doses de varfarina em presença do genótipo VKORC1 -1639. Foram feitos gráficos das doses de varfarina em pacientes seleccionados, sensíveis ou resistentes à varfarina (ver o quadro 1 para saber pormenores) em presença de diferentes genótipos na posição -1639 do promotor VKORC1. * Indivíduos com variantes CYP2C9, incluindo CYP2C9*3, T299A (isto é, o resíduo aminoácido 299 passou de T para A) e P382L (isto é, o resíduo aminoácido 382 passou de P para L).

Figura 2. Medições relativas dos níveis de actividade da luciferase em células HepG2. Repórter pGL3 de luciferase contendo o alelo A (pGL3-A) ou o alelo G (pGL3-G) na posição -1639 do promotor. Apresenta-se a média de dados provenientes de 9 experiências e as barras de erro

representam o desvio padrão; utilizou-se pGL3 básico como referência, sem nenhuma sequência do promotor inserida.

Figura 3. Sequência genómica do gene VKORC1 (Nº AY587020 de admissão no Genbank). O local de início da transcrição está no nucleótido número 5086 (a negrito e dentro de um rectângulo) nesta figura, sendo designado por +1 do gene na nomenclatura tradicional. O A do códon de iniciação da tradução ATG (a negrito) está no nucleótido número 5312 nesta figura, sendo a recomendação da "Human Genome Variation Society" que seja designado por +1 no novo sistema de nomenclatura. O polimorfismo do promotor descrito na presente invenção está sublinhado e a negrito (nucleótido número 3673 nesta sequência), estando na posição -1413 no sistema tradicional e na posição -1639 no novo sistema recomendado.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA

Chegou-se à conclusão de que há um polimorfismo no promotor do gene VKORC1, associado à sensibilidade à varfarina. Este polimorfismo consegue explicar as diferenças interindividuais e interétnicas no que diz respeito às necessidades de dosagem de varfarina. Além disso, o polimorfismo também está associado à actividade do promotor. O promotor de VKORC1 que possui um G na posição -1639 (numerada em relação ao primeiro nucleótido do códon de iniciação) é 44% mais activo do que o promotor que possui um A na mesma posição. Os pacientes com o polimorfismo -1639A são mais sensíveis à varfarina. Os pacientes homozigóticos como o grupo AA na posição -1639 são os que necessitam de menores doses, os pacientes heterozigóticos com o grupo AG têm necessidade de doses intermédias e os pacientes

homozigóticos com o grupo GG são os que necessitam das dosagens mais elevadas. Assim, a sequência do promotor ou a actividade do gene VKORC1 de um paciente pode servir para se prever a quantidade de varfarina que deve ser prescrita a esse paciente.

Antes de se descrever a invenção de forma mais minuciosa, irão ser definidos os termos utilizados na presente memória descritiva, conforme adiante se indica, salvo quando especificado de outro modo.

Definições

O termo "varfarina" abrange os derivados da coumarina que possuem uma actividade anticoagulante. De acordo com uma variante preferencial, a varfarina é o composto 4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-2H-1-benzopiran-2-ona (isto é, 3- α -feneil- β -acetiletil-4-hidroxicoumarina). O produto comercial vulgar é uma mistura racémica do isómero R e do isómero S. O termo "varfarina" compreende o isómero R, o isómero S, todas as misturas racémicas e todos os seus sais. De uma maneira concreta, são designados por varfarina os produtos "Coumadin, Marevan, Panwarfin, Prothromadin, Tintorane, Warfilone, Waran, Athrombin-K", varfarina deanol, "Adoisine", varfarina ácida, "Coumafene, Zoocoumarin, Phenprocoumon", dicumarol, brodifacoum, difenadiona, clorofacinona, bromadiolona e acenocoumarol.

O termo "oligonucleótido", tal como aqui utilizado, designa uma molécula que compreende entre 2 e cerca de 100 nucleótidos contíguos ligados através de ligações nucleotídicas. Um oligonucleótido pode ter um comprimento pelo menos igual a cerca de 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 nucleótidos. Além disso, um oligonucleótido tem,

preferencialmente, um comprimento até cerca de 200, e mais preferencialmente até cerca de 150, 100, 75, 50, 40, 30, ou 20 nucleótidos.

Uma "sonda" de hibridação é um oligonucleótido que se liga, de uma maneira específica, a uma cadeia de ácido nucleico complementar. Tais sondas compreendem os ácidos nucleicos de péptidos. As sondas podem ter um comprimento qualquer, conveniente para hibridação específica com a sequência de ácido nucleico destinatária. O comprimento mais conveniente da sonda pode variar em função do processo de hibridação em que a sonda irá ser utilizada; por exemplo, determinados comprimentos particulares podem ser mais adequados para utilização em microssistemas industriais, ao passo que outros comprimentos podem ser mais convenientes para utilização em processos clássicos de hibridação. Tais otimizações são da competência de especialistas na matéria. As sondas e os iniciadores convenientes possuem, tipicamente, um comprimento compreendido entre cerca de 8 nucleótidos e cerca de 100 nucleótidos. Por exemplo, as sondas e os iniciadores podem ter um comprimento de cerca de 8-20, 10-30, 15-40, 50-80 e, preferencialmente, 12-20 nucleótidos. A sequência de nucleótidos pode corresponder à sequência codificadora do gene, ou ao complemento da sequência codificadora do gene.

Processos e composições

Ao fazer-se a comparação das sequências do ADN de CYP2C9 e VKORC1 de pacientes chineses com sensibilidade ou resistência à varfarina (Exemplo 1), descobriu-se que as variantes da sequência de ADN de CYP2C9 se encontravam presentes apenas em 5,4-7,3% da população chinesa de Han.

As variantes eram fundamentalmente CYP2C9*3. Além disso, duas mutações com sentido incorrecto, identificadas neste estudo, incluindo uma nova mutação (P382L), nunca antes assinalada, são raras e apenas se encontram presentes em pacientes sensíveis à varfarina. As variantes CYP2C9 também revelaram uma prevalência diferente em populações étnicas diferentes. O CYP2C9* 1/*2 encontrava-se presente em 20% da população caucasiana (17); no entanto, estava totalmente ausente na população chinesa deste estudo. Assim sendo, as mutações em CYP2C9 apenas podem ser responsáveis por uma pequena percentagem de sensibilidade à varfarina na população chinesa e não conseguem explicar as diferenças interétnicas, em termos de necessidades de dosagem de varfarina.

Por outro lado, concluímos que as modificações no gene VKORC1 conseguem alterar as necessidades de dosagem de varfarina, quer interindividualmente na população chinesa quer interetnicamente entre população chinesa e caucasiana. Os pacientes com genótipo de polimorfismo AA do promotor -1639 tinham menores necessidades de dosagem, ao passo que os genótipos AG/GG tinham maiores necessidades de dosagem (Exemplos 1 e 2). Além disso, os grupos homozigóticos AA são raros na população caucasiana, existindo todavia este genótipo na maior parte da população chinesa (Exemplo 3). As diferenças de frequências de genótipos entre população caucasiana e população chinesa, e a correlação de AA com a sensibilidade à varfarina, estão em conformidade com aquilo que foi observado clinicamente, ou seja, a população chinesa necessita de uma dose menor do que a população caucasiana.

Assim sendo, de acordo com um dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um processo para determinar o

intervalo de dosagem de varfarina para um paciente, o qual consiste em investigar a sequência do promotor do gene VKORC1 desse paciente. A sequência do promotor contém, preferencialmente, menos de 10%, 8%, 6%, 4%, 3%, 2% ou 1% de variação no domínio das 3 kb contadas a partir do local de início da tradução, comparativamente com a SEQ ID NO: 1. Mais preferencialmente, o promotor possui menos de 20, 15, 12, 10, 8, 6, 4, 3 ou 2 variações de bases pontuais nesta região de 3 kb. Uma variação sequencial deste tipo, conjuntamente com uma modificação na actividade do promotor, é um indicador do intervalo de dosagem em que a varfarina deve ser prescrita.

Em particular, investiga-se a sequência na posição -1639 do gene VKORC1. Este SNP pode ser utilizado por si só para se prever a sensibilidade à varfarina, sem ter de ser pesquisado nenhum outro genótipo. Assim, o grupo homozigótico AA nesta posição é indicador de sensibilidade à varfarina, o grupo heterozigótico AG indica uma sensibilidade intermédia e os pacientes com o grupo homozigótico GG são relativamente resistentes. A dosagem real de varfarina que deve ser administrada aos pacientes que são sensíveis, medianamente sensíveis ou relativamente resistentes irá variar em função da formulação de varfarina e também com os indícios e os sintomas do paciente e pode ser determinada pelo médico que prescreva a varfarina. Por exemplo, o nosso estudo (Exemplo 1) revela que num grupo seleccionado de pacientes com sensibilidade ou com resistência à varfarina, os que tinham necessidade das doses mais baixas (média de 1,19 mg/dia, variando entre 0,71-1,50 mg/dia) tinham um genótipo AA, os que tinham necessidades de doses intermédias (média de 8,04 mg/dia, variando entre 6,07-10 mg/dia) tinham um genótipo

heterozigótico AG e os que necessitavam de doses mais elevadas (média de 9,11 mg/dia, variando entre 8,57-10 mg/dia) estavam associados ao genótipo homozigótico GG. Em pacientes escolhidos aleatoriamente (Exemplo 2), o genótipo AA está associado a uma dose de manutenção ($2,61 \pm 1,10$ mg/dia) menor do que a dos pacientes associados aos genótipos AG e GG ($3,81 \pm 1,24$ mg/dia). Estes intervalos de variação podem servir de pontos de partida para determinação das doses de varfarina.

A sequência genómica do gene VKORC1 pode ser obtida no Genbank com o nº de admissão AY587020 (SEQ ID NO: 1; Figura 3). A sequência de ARNm da isoforma 1 de VKORC1 está disponível com o número de admissão NM_024006.4. Nestas duas sequências, o local de início de transcrição é designado por +1, pelo que o polimorfismo do promotor indicativo da sensibilidade à varfarina, aqui descrito, poderia estar localizado na posição -1413. No entanto, de acordo com recomendações recentes da 'Human Genome Variation Society (HGVS)' para a descrição das variações de sequências (<http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/>), recomenda-se que o promotor SNP seja descrito tomando por referência A do códon de iniciação da tradução ATG. Ao abrigo desta nomenclatura, o A do códon ATG (Met), de iniciação da tradução, de NM_024006.4 ou AY587020 poderia estar na posição +1, o promotor SNP aqui descrito poderia estar na posição -1639, e o polimorfismo G>A desta posição poderia ser designado por "NM_024006.4:c.-1639G>A". Convém salientar que o polimorfismo -1639 G>A (ou mais rigorosamente "NM_024006.4:c.-1639G>A") desta memória descritiva é o mesmo polimorfismo -1413 G>A de acordo com a numeração tradicional da sequência do promotor.

Para além do polimorfismo específico (v.g., AA, AG ou GG na posição -1639), os marcadores genéticos que estão ligados a cada um dos SNP específicos podem ser utilizados para se prever também a correspondente sensibilidade à varfarina. Isto deve-se ao facto de os marcadores genéticos próximos do SNP relevante terem tendência para serem segregados conjuntamente, ou para revelarem um desequilíbrio de ligação, com o SNP relevante. Em consequência, a presença destes marcadores (marcadores genéticos equivalentes) é um indicador da presença do SNP relevante, o que é indicador, por sua vez, do nível de sensibilidade à varfarina.

O polimorfismo do promotor -1639 A > G do VKORC1 está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo intrónico 1173 C>T de VKORC1, recentemente descrito por D'Andrea *et al.* (27), e pode explicar, eventualmente, os resultados que levam a concluir que pacientes italianos com o genótipo 1173 TT necessitavam de uma dose diária média menor do que os de genótipos CT ou CC. O nosso estudo também comprovou que o polimorfismo 3730 (isto é, rs7294) G > A que está localizado na região 3' não traduzida, está em desequilíbrio de ligação com -1639 A > G e 1173 C > T na população chinesa. Dito de forma concreta, o alelo 3730G está associado ao alelo -1639A e ao alelo 1173T. Outros marcadores genéticos equivalentes do -1639 SNP compreendem o rs9934438 (intrão 1), o rs8050894 (intrão 2) e o rs2359612 (intrão 2). Assim, o -1639A está ligado com T em rs9934438, com C em rs8050894, com T em rs2359612 e com G em rs7294, ao passo que o -1639G está ligado com C em rs9934438, com G em rs8050894, com C em rs2359612 e com A em rs7294.

O marcador genético equivalente pode ser qualquer marcador, incluindo os microssatélites e os marcadores de polimorfismo de nucleótidos singulares (SNP). De preferência, os marcadores genéticos úteis estão a uma distância de 200 kb, ou menos, da posição -1639 do VKORC1. Mais preferencialmente, os marcadores estão a cerca de 100 kb, 80 kb, 60 kb, 40kb, 20 kb, 15 kb, 10 kb ou 5 kb, ou menos, da posição -1639 do VKORC1.

Um dos aspectos da presente invenção proporciona oligonucleótidos que são capazes de hibridar para se obter os SNP da presente invenção. O oligonucleótido irá ser útil, por exemplo, como sonda de hibridação ou como iniciador para a detecção da sequência do promotor do gene VKORC1. O oligonucleótido compreende, preferencialmente, a sequência TGGCCGGGTGC (3668 a 3678 da SEQ ID NO: 1), ou o seu complemento. Com a finalidade de se fazer a hibridação, é preferível que a sequência correspondente à posição -1639 esteja próxima do centro do oligonucleótido. De preferência, há pelo menos 4 nucleótidos em cada lado da sequência correspondente a -1639. A posição correspondente a -1639 é, mais preferencialmente, flanqueada pelo menos por 5, 6, 7, 8 ou 9 nucleótidos em cada lado.

As hibridações são efectuadas normalmente em condições restritivas, por exemplo, com uma concentração salina não superior a 1 M e a uma temperatura não inferior a 25°C. Por exemplo, as condições correspondentes a 5xSSPE (750 mM NaCl, mM fosfato de Na, mM EDTA, pH 7,4) e a uma temperatura de 25-30°C, ou as correspondentes condições equivalentes, são adequadas para hibridações de sondas específicas de nucleótidos. Mais preferencialmente, faz-se uma lavagem em condições menos restritivas após a

hibridação, a qual consiste em trabalhar, por exemplo, a 42°C, 5xSSC e com 0,1% de SDS; ou a 50°C, 2xSSC e com 0,1% de SDS. As condições de trabalho de elevado rigor são mais preferíveis e prevêm, por exemplo, que se trabalhe a 65°C, com 0,1xSSC e com 0,1% de SDS. É possível determinar condições equivalentes fazendo variar um ou vários dos parâmetros, conforme é sabido na especialidade, mantendo simultaneamente um grau semelhante de identidade ou de similaridade entre a sequência de nucleótidos destinatária e o iniciador ou sonda utilizados.

O promotor -1639 de SNP está localizado numa Caixa E (a sequência de consenso das caixas E é CANNTG) e a menos de uma curta distância (200 bp) há mais três caixas E suplementares. Demonstrou-se que as caixas E são elementos importantes na mediação da transcrição, específica dos tipos de células/tecidos, por exemplo, nos músculos, neurónios, fígado e pâncreas (28, 29). Modificando a segunda base de A para G, conforme observado no local -1639, poderia abolir o consenso da caixa E e alterar a actividade do promotor. Isto foi claramente demonstrado pelo ensaio com o promotor, que permitiu concluir que nas células HepG2 a actividade do promotor aumentou 44% quando as sequências de consenso foram abolidas (figura 2). Sem se pretender impor qualquer limitação de natureza teórica, isto sugere que a caixa E pode funcionar como um local de ligação do repressor em células HepG2. Uma vez que as células HepG2 são provenientes de um hepatoma, é provável que a caixa E -1639 reprima a transcrição no fígado.

O facto de as pessoas com o genótipo -1639 GG necessitarem de uma dose mais elevada de varfarina pode ser explicado conforme a seguir se indica. O gene VKORC1

codifica a subunidade 1 do complexo de vitamina K e epóxido-redutase, que é responsável por regenerar a forma reduzida de vitamina K. A forma reduzida de vitamina K é solicitada pela γ -carboxilase e a γ -carboxilação dos factores de coagulação dependentes da vitamina K (factores II, VII, IX e X) é essencial para a coagulação do sangue. Quando a actividade do promotor de VKORC1 aumenta, um nível elevado de ARNm de VKORC1 pode conduzir a uma maior actividade de VKOR (25) e aumentar, consequentemente, a eficiência de regeneração da vitamina K reduzida. Deste modo, a γ -carboxilação dos factores de coagulação, dependentes da vitamina K, aumenta devido ao nível mais elevado de vitamina K reduzida. A varfarina actua bloqueando a síntese dos factores de coagulação e pelo facto de haver factores de coagulação mais activos poderia fazer com que fosse necessária mais varfarina para que houvesse o seu efeito anticoagulante. Uma vez que o fígado é o órgão primário para a síntese de factores de coagulação dependentes da vitamina K e a expressão do VKORC1 atinge o seu valor máximo no fígado, é provável que uma alteração de 44% no nível de VKORC1 no fígado tenha um impacto significativo no processo de coagulação do sangue. Assim, as necessidades de dosagem de varfarina estão associadas ao polimorfismo do gene VKORC1 e à sua actividade promotora.

Fazemos observar que qualquer sequência na posição -1639 do promotor de VKORC1, diferente da de um A, irá destruir a caixa E e aumentar a actividade do promotor. Por sua vez, um aumento da actividade do promotor vai aumentar as necessidades de dosagem de varfarina. Posto isto, a sequência do promotor, em particular a sequência na posição -1639 é um indicador das dosagens de varfarina. Mais ainda, outras

variantes da presente invenção proporcionam processos para determinação das doses de varfarina, ou para determinação da sensibilidade à varfarina, mediante a detecção da actividade promotora do gene de VKORC1. De igual modo, o nível de produto génico do gene VKORC1 (quer seja ARNm ou proteína) ou de actividade de VKOR também pode reflectir as necessidades de dosagem de varfarina. A actividade do promotor de VKORC1, o nível de ARNm, o nível de proteínas ou a actividade de VKOR, que é pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% ou 40% superior à de um paciente com o genótipo AA, é um indicador da necessidade de se prescrever uma dose de varfarina superior à necessária para o paciente com o genótipo AA.

Os processos para a determinação das actividades do promotor ou dos níveis de ARNm ou de proteínas são perfeitamente conhecidos na especialidade. Em determinados casos, é possível recorrer à PCR para se detectar o nível de ARNm. Noutros casos, são utilizados anticorpos específicos para medir a proteína VKORC1. As actividades do promotor podem ser examinadas, por exemplo, isolando a sequência do promotor a partir do paciente relevante, recorrendo a uma amostra de sangue periférico, ligando a sequência do promotor a um gene repórter, expressando o gene repórter e determinando a quantidade de repórter produzido. Os processos para a medição das actividades de VKOR também são perfeitamente conhecidos na especialidade.

Os exemplos a seguir apresentados servem para ilustrar a invenção e não devem ser considerados, de forma alguma, como limitativos do âmbito da presente invenção. Embora a presente invenção seja particularmente apresentada e descrita tomando como referência as suas variantes preferenciais, faz-se observar aos especialistas na matéria

que é possível introduzir diversas modificações, no que diz respeito à forma e pormenores, sem que haja afastamento do espírito e âmbito da invenção, tal como definida nas reivindicações anexas.

EXEMPLOS

Nos exemplos subsequentes, são utilizadas abreviaturas que possuem as significações a seguir indicadas. As abreviaturas não definidas têm as significações geralmente aceites.

°C = graus Celsius

hr = hora

min = minuto

seg ou s = segundo

μM = micromolar

mM = milimolar

M = molar

mL = mililitro

μL = microlitro

mg = miligrama

μg = micrograma

mol = mole

pmol = picomole

ASO = oligonucleótido específico do alelo

CYP2C9 = citocromo P450, subfamília IIC, polipeptido 9

INR = índice internacional normalizado

LD = desequilíbrio de ligação

NTP = nucleósido-trifosfato

PBS = soluto salino tamponado com fosfato

PCR = reacção em cadeia com polimerase

SNP = polimorfismo nucleotídico pontual

VKORC1 = complexo de vitamina K e epóxido-redutase, subunidade 1

Materiais e métodos

Pacientes

Foram recrutados 16 pacientes que receberam varfarina em dose baixa ou alta em clínicas cardiovasculares pertencentes a quatro centros médicos importantes em Taiwan (National Taiwan University Hospital, Kaohsiung Medical University Hospital, Taipei General Veteran Hospital e Shin-Kong Wu Ho-Su Memorial Hospital). A dose média de manutenção de varfarina em pacientes chineses é de 3,3 mg/dia (8, 9). Assim sendo, considerámos que os pacientes que receberam uma dose de manutenção $\leq 1,5$ mg por dia eram sensíveis à varfarina (Quadro 1, 11 pacientes) e os pacientes que receberam uma dose de manutenção ≥ 6 mg por dia foram considerados como resistentes à varfarina (Quadro 1, 5 pacientes). A definição de paciente resistente à varfarina fundamentou-se no facto de sabermos que nenhum dos pacientes seleccionados aleatoriamente (Quadro 2) tinha uma dose de varfarina superior a 6 mg/dia. Isto está em contraste com os pacientes caucasianos que tinham uma dose de manutenção média compreendida entre 5,1 e 5,5 mg/dia (20, 27).

Calculou-se a dose média diária de varfarina a partir de um período de uma semana e registou-se o último índice internacional normalizado (INR) de cada paciente. Os 104 pacientes seleccionados aleatoriamente, que receberam varfarina, independentemente da dose, tinham um intervalo de variação dos índices INR entre 1,4 e 3 para os mesmos 4

hospitais (Quadro 2). As prescrições de varfarina corresponderam a: substituição de válvulas (90 pacientes), trombose das veias profundas (5 pacientes), fibrilação arterial (5 pacientes) e colapso cardíaco (4 pacientes). Obteve-se informação clínica para cada participante (incluindo idade, sexo, massa corporal e dose média diária de manutenção). No momento da colheita de amostras sanguíneas, cada paciente havia recebido uma dose de manutenção constante, pelo menos durante 3 semanas. Os pacientes com cânceres de fígado, rim e gastrintestinais, ou com problemas hemorrágicos anormais, antes da terapia com varfarina, foram excluídos.

Além disso, foram utilizadas amostras de ADN de 92 caucasianos não tratados (Nº de Cat., HD100CAU, National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) Human Genetic Cell Repository, Camden, NJ, EUA), como voluntários de referência caucasianos. Foram utilizadas amostras de ADN de 95 voluntários saudáveis, seleccionados aleatoriamente a partir de um banco de referências biológicas, utilizados como elementos de referência para a etnia chinesa, ao abrigo de um estudo populacional à escala nacional, em que foram recrutados 3312 descendentes de chineses de Han com base na distribuição geográfica em Taiwan. Os indivíduos de referência chineses e todos os pacientes participantes que receberam uma terapia com varfarina eram chineses de Han sem qualquer relação entre si, residentes em Taiwan. Os chineses de Han formam o maior grupo étnico em Taiwan, constituindo genericamente 98% da população. Nenhum dos participantes era aborígine de Taiwan, os quais representam os restantes 2% da população de Taiwan.

O estudo foi aprovado pelo órgão institucional competente, tendo sido obtida a anuência explícita de todos os participantes.

Sequenciação de ADN e genotipificação de polimorfismo de nucleótidos pontuais (SNP)

Isolou-se ADN genómico utilizando um sistema de purificação de ADN "PUREGENE™" (Gentra systems, Minnesota, EUA). Em primeiro lugar, fez-se a determinação das sequências de ADN de CYP2C9 e VKORC1, por sequenciação directa (analizador de ADN 3730 da Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em 16 pacientes chineses de Han que revelavam sensibilidade ($\leq 1,5$ mg/dia, 11 pacientes) e resistência ($\geq 6,0$ mg/dia, 5 pacientes) à varfarina. Os iniciadores foram concebidos especificamente para as junções de tipo intrão-exão, para os exões e para os 2 kpb a montante do local de início da transcrição para ambos CYP2C9 e VKORC1, utilizando o programa para o iniciador de PCR 'Primer3' (http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Os iniciadores utilizados para detectar as variantes no promotor de VKORC1 foram: 5'-CAGAAGGGTAGGTGCAACAGTAA (SEQ ID NO:2; cadeia de sentido directo localizada 1,5 kb a montante do local de início da transcrição) e 5'-CACTGCAACTTGTTTCTCTTTCC (SEQ ID NO:3; cadeia anti-sentido localizada 0,9 kb a montante do local de início da transcrição). As reacções em cadeia com polimerase (PCR) foram efectuadas num volume final de 25 μ L, contendo 0,4 μ M de cada iniciador, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM dos dNTP e 1 unidade de Taq™ de HotStart (Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA). As condições de amplificação consistiram numa

desnaturação inicial durante 12 minutos a 96°C, seguindo-se 34 ciclos de PCR em 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C e 40 segundos a 72°C.

Recorreu-se então à espectrometria de massa 'MALDI-TOF' (Sistema SEQUENOM MassARRAY, Sequenom, San Diego, CA, EUA) para se fazer a despistagem das variantes identificadas em 104 pacientes chineses seleccionados aleatoriamente que receberam varfarina, 95 voluntários chineses normais e 92 voluntários caucasianos normais. Dito de forma abreviada, os iniciadores e as sondas foram concebidos utilizando a aplicação informática 'SpectroDESIGNER' (Sequenom). Efectuou-se a PCR multiplex e os dNTP não incorporados foram desfosforilados utilizando fosfatase alcalina de camarão (Hoffman-LaRoche, Basileia, Suíça), seguindo-se o prolongamento dos iniciadores. As reacções de prolongamento dos iniciadores purificados foram distribuídas por pontos sobre uma pastilha de silício elementar 384 (SpectroCHIP, Sequenom), analisadas com o espectrómetro de massa 'Bruker Biflex III MALDI-TOF SpectroREADER' (Sequenom) e depois fez-se o processamento do espectro resultante com o aparelho 'SpectroTYPER' (Sequenom).

Ensaio repórter de luciferase

Construção do plasmídeo

Para se analisar a actividade do promotor de VKORC1, efectuou-se em primeiro lugar a clonagem do promotor de VKORC1, que abrange o polimorfismo -1639 (desde -1798 até -35) de pacientes com os genótipos -1639 AA e -1639 GG, num vector 'pGEM-T Easy' (Promega, Madison, WI, EUA), sendo o iniciador directo o seguinte: 5'-ccgctcgagtagatgtgagaaacagcatctgg (SEQ ID NO:4; contendo o local de restrição *Xho*I), e sendo o

iniciador inverso o seguinte: 5'-cccaagcttaaaccagccacggagcag (SEQ ID NO:5; contendo um local de restrição *HindIII*). O fragmento que continha o promotor de VKORC1 foi libertado do vector 'pGEM-T Easy' fazendo digerir esse vector com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII* e depois foi subclonado nos locais múltiplos de clonagem (*XhoI* e *HindIII*) do vector básico pGL3 (Promega). O vector pGL-3 contém o ADNC codificado para a luciferase do pirilampo, que ao ser fundido com um promotor pode ser utilizado para analisar a actividade do promotor inserido após transfecção em células de mamíferos. O vector que contém o genótipo -1639 G/G recebeu a designação de pGL3-G e o vector que contém o genótipo -1639 A/A recebeu a designação de pGL3-A. As sequências do promotor de VKORC1 em ambos os vectores foram confirmadas por análise de sequenciação directa.

Cultura de células e ensaio duplo do repórter de luciferase

Manteve-se células HepG2 a desenvolverem-se em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal de vitelo enriquecido com penicilina na concentração de 100 unidades /mL, estreptomicina na concentração de 100 µg/mL e 2 mM de L-glutamina. Vinte e quatro horas antes da transfecção, efectuou-se uma inoculação de $1,5 \times 10^5$ células em cada cavidade de uma placa de 12 cavidades. No dia da transfecção, cada cavidade foi co-transfectada com 1,5 µg do vector pGL3 e 50 ng do vector pRL-TK (Promega), utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O vector pRL-TK codificava a luciferase de *Renilla* transcrita por um promotor HSV-TK que foi utilizado como referência interna para normalizar a expressão da luciferase do pirilampo. Decorridas quarenta e

oito horas após a transfecção, as células foram desmembradas por citólise em tampão de lise passivo (Promega). Acrescentou-se o lisado celular ao substrato de luciferase (sistema duplo repórter de luciferase, Promega) e efectuou-se a medição das actividades das luciferases do pirilampo e de *Renilla* com um luminómetro (SIRIUS, Pforzheim, Alemanha).

Análise estatística

Efectuou-se a contagem das frequências dos genótipos de cada SNP. Utilizou-se o teste do X quadrado para comparar as frequências dos genótipos de cada SNP para os três grupos de amostragem. Efectuou-se o teste T e o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para fazer as comparações múltiplas dos níveis das doses médias entre os diferentes grupos genotípicos. Avaliou-se o desequilíbrio das ligações intermarcadores, fazendo duas medições, D' e r^2 , sendo os cálculos feitos utilizando o algoritmo 'Graphical Overview of Linkage Disequilibrium' (GOLD, <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/GOLD/>).

EXEMPLO 1

Variantes das sequências de ADN de CYP2C9 e VKORC1 em pacientes chineses seleccionados com sensibilidade ou resistência à varfarina

A dose média de manutenção de varfarina nos chineses é de 3,3 mg/dia (8, 9). Assim sendo, considerou-se que os pacientes que receberam uma dose de manutenção $\leq 1,5$ mg por dia eram sensíveis à varfarina (Quadro 1, 11 pacientes) e que os pacientes que receberam uma dose de manutenção de varfarina ≥ 6 mg por dia era resistentes à varfarina

(Quadro 1, 5 pacientes, ver Materiais e Métodos para obter mais pormenores). A sequenciação de regiões codificadoras, as junções exão-intrão e a região promotora do gene de CYP2C9 revelaram a existência de três variantes de sequências em 4 dos 11 pacientes sensíveis à varfarina. As variantes foram: 1075 A > C (1359L conhecido por CYP2C9*3), 895 A > G (T299A) e 1145 C > T (P382L). O CYP2C9*3 foi detectado em 3 pacientes (indivíduos 1, 3 e 5, Quadro 1). O indivíduo 5, para além de CYP2C9*3, também tinha a modificação 895 A > G (T299A), conforme anteriormente descrito (7). Foi detectada uma nova mutação exónica 1145 C > T (P382L), no quarto paciente (indivíduo 6). Conforme se observa no quadro 1, as variantes do gene de CYP2C9 não estavam presentes em todos os pacientes sensíveis à varfarina e estavam totalmente ausente em todos os pacientes resistentes à varfarina.

Quadro 1. Demografia dos pacientes e variantes das sequências de ADN identificadas.

Caso n°	Dose (mg/d)	INR	Idade (anos)	Sexo	Massa corporal (kg)	VKORC1 -1639	VKORC1 1173	#CYP2C9 (variantes)
>Grupo sensível à varfarina (dose ≤ 1,5 mg/dia, n= 11)								
1	0,71	3,23	65	F	42	AA	TT	CYP2C9*3
2	1	2,69	74	M	65	AA	TT	normal
3	1	3,23	70	M	66	AA	TT	CYP2C9*3
4	1,25	1,5	84	F	50	AA	TT	normal
5	1,25	1,96	68	M	75	AA	TT	CYP2C9*3 895A>G (T299A)
6	1,25	2,5	71	F	70	AA	CT	1145C>T (P382L)

Caso n°	Dose (mg/d)	INR	Idade (anos)	Sexo	Massa corporal (kg)	VKORC1 -1639	VKORC1 1173	#CYP2C9 (variantes)
7	1,25	2	71	F	80	AA	TT	normal
8	1,25	2,9	72	F	67	AA	TT	normal
9	1,25	1,59	67	M	58	AA	TT	normal
10	1,43	2,05	58	F	42	AA	TT	normal
11	1,5	2,24	61	M	65	AA	TT	normal
Grupo resistente à varfarina (dose $\geq$ 6 mg/dia, n=5)								
12	6,07	2,82	48	F	52	AG	CT	normal
13	8,57	2,09	63	F	58	GG	CC	normal
14	8,75	2,32	26	M	88	GG	CC	normal
15	10	1,3	46	M	64	AG	CT	normal
16	10	2,33	58	F	61	GG	CC	normal

Efectuamos também a sequenciação do promotor, das regiões codificadoras e das junções exão-intrão do gene VKORC1. Foi detectada uma variante (3730 G>A) que estava localizada na região não traduzida de 3' (UTR) de VKORC1. Além disso, foi detectado um polimorfismo do promotor, -1639 G > A (ou -1413, utilizando o local de início de transcrição como sendo +1) na região de montante do VKORC1. Este polimorfismo revelou uma associação com a sensibilidade à varfarina, na medida em que todos os pacientes sensíveis à varfarina eram homozigóticos AA na posição -1639. Por outro lado, os pacientes resistentes à varfarina revelaram ser ou heterozigóticos AG ou homozigóticos GG (Quadro 1). Quando se traçou um gráfico das doses de varfarina, em função dos genótipos -1639, ficou demonstrado que os pacientes com o genótipo AA tinham necessidade de doses mais baixas (média de 1,19 mg/dia, intervalo entre 0,71-1,50 mg/dia), os heterozigóticos AG tinham uma necessidade de doses intermédias (média de 8,04

mg/dia, intervalo entre 6,07-10 mg/dia) e os homozigóticos de genótipo GG tinham necessidade da dose mais elevada (média de 9,11 mg/dia, intervalo entre 8,57-10 mg/dia) (figura 1).

Para além de -1639 G > A, também foi identificado nos nossos pacientes um polimorfismo 1173 C > T do intrão 1, já descrito por D'Andrea *et al.* (27). Estes dois polimorfismos pareciam estar em forte desequilíbrio de ligação (LD) (Quadro 1). Concluiu-se que os pacientes sensíveis à varfarina, com o genótipo -1639 AA, estavam associados ao genótipo 1173 homozigótico TT, com excepção de um paciente (indivíduo 6). Nos pacientes resistentes à varfarina, concluiu-se que os pacientes com o genótipo -1639 heterozigótico AG estavam associados ao genótipo 1173 heterozigótico CT e verificou-se também que os homozigóticos -1639 GG estavam associados aos homozigóticos 1173 TT (Quadro 1).

EXEMPLO 2

Polimorfismo -1639 G>A de VKORC1 em pacientes chineses aleatórios que receberam varfarina

Para se investigar melhor se o polimorfismo -1639 G > A estava associado com as diferenças interindividuais nas dosagens de varfarina, fez-se a genotipificação de 104 pacientes que receberam varfarina independentemente da dose, recorrendo à espectrometria de massa 'MALDI-TOF'. Os grupos AA e AG/GG não apresentaram diferenças respeitantes à idade, sexo e INR (Quadro 2). Verificou-se que apenas dois pacientes eram homozigóticos para GG, tendo sido agrupados conjuntamente com os AG para análise estatística. Efectuamos

a análise dos dados independentemente da presença de outras variáveis perturbadoras, tais como a dieta e outras medicações. Conforme se observa do Quadro 2, o grupo AA teve necessidade de doses significativamente menores (2,61 mg/dia) do que o grupo AG/GG (3,81 mg/dia). As diferenças foram significativas quer pelo teste T ($p < 0,0001$) quer pelo teste de Wilcoxon Mann Whitney ($p = 0,0002$) entre os grupos AA e AG/GG.

Quadro 2. Doses médias e outras características clínicas de pacientes seleccionados aleatoriamente, classificados pela resposta à varfarina, de acordo com os genótipos.

Genótipo	Dose de varfarina (mg/dia)	INR	Idade (anos)	Sexo (M/F)
VKORC1-1639				
AA (n=83)	2,61 $\pm$ 1,10 ^a	2,03 $\pm$ 0,45	57,5 $\pm$ 14,8	43/40
AG+GG (n=21)	3,81 $\pm$ 1,24	2,08 $\pm$ 0,47	60,4 $\pm$ 13,1	13/8
^a valor P de comparação entre os grupos AA e AG+GG. Valor P <0,0001 utilizando o teste T. Valor P = 0,0002 utilizando o teste de Wilcoxon Mann Whitney. Os dados representam a média $\pm$ DP.				

EXEMPLO 3

Frequências dos genótipos do polimorfismo -1630 G>A de VKORC1 e variantes de CYP2C9 em chineses e caucasianos

Sabe-se que a população chinesa necessita de uma dose de manutenção de varfarina muito menor do que a população de caucasianos. Para se testar se as diferenças nas frequências do genótipo -1639 de VKORC1 poderiam ser responsáveis pelas diferenças interétnicas nas dosagens de varfarina, efectuou-

se a genotipificação de 95 voluntários chineses normais de Han e de 92 voluntários normais caucasianos. Na população caucasiana, o genótipo homozigótico AA revelou a frequência mais baixa, ao passo que os genótipos AG e GG constituíram a maior parte da população (respectivamente 14,2%, 46,7% e 39,1%, Quadro 3). Pelo contrário, na população chinesa, o genótipo homozigótico AA constitui a maior parte da população (82,1%), sendo a parte restante da população de genótipo heterozigótico AG (17,9%). Não foi detectado nenhum genótipo homozigótico GG nesta população seleccionada aleatoriamente. Esta proporção foi também semelhante nos 104 pacientes testados com varfarina, em que se conclui que 79,8% eram homozigóticos AA, 18,3% eram heterozigóticos AG e a parte restante de 1,8% eram homozigóticos GG. As diferenças nas frequências de genótipos entre o grupo caucasiano e os dois grupos chineses foram significativas, com valores P inferiores a 0,0001. Estas diferenças entre os dois grupos étnicos (caucasianos e chineses) e a correlação AA com a sensibilidade à varfarina estão em concordância com a observação clínica de que a população chinesa necessita de uma dose menor do que a população caucasiana.

Quadro 3. Frequências de genótipos do polimorfismo do promotor de VKORC1 (-1639 G>A) e de variantes de CYP2C9 em chineses e caucasianos.

Genótipo	Caucasianos (n=92)	Chineses (n=95)	Pacientes chineses tratados com varfarina, seleccionados aleatoriamente (n=104)
VKORC1 -1639			
AA	13 (14,2%)	78 (82,1%)	83 (79,8%)

Genótipo	Caucasianos (n=92)	Chineses (n=95)	Pacientes chineses tratados com varfarina, seleccionados aleatoriamente (n=104)
AG	43 (46,7%)	17 (17,9%)	19 (18,3%)
GG	36 (39,1%)	0 (0%)	2 (1,9%)
Variantes de			
CYP2C9			
2C9*1*2	20,4%	0 (0%)	0 (0%)
2C9*2*2	0,9%	0 (0%)	0 (0%)
2C9*1*3	11,6%	7 (7,3%)	4 (5,4%)
2C9*3*3	0,4%	0 (0%)	0 (0%)

Valor P <0,0001, comparação entre populações caucasianas e chinesas.

Valor P <0,0001, comparação entre pacientes caucasianos e chineses tratados com varfarina, seleccionados aleatoriamente.

Valor P = 0,817, comparação entre pacientes chineses e pacientes tratados com varfarina, escolhidos aleatoriamente. ^a O CYP2C9*1 é o tipo selvagem do CYP2C9. Os CYP2C9*2 e CYP2C9*3 são variantes em que a cistina substitui a arginina no resíduo 144 e a leucina substitui a isoleucina no resíduo 359, respectivamente. As frequências nos caucasianos foram obtidas a partir de dados publicados (17).

^b A frequência do CYP2C9*3 foi obtida por genotipificação de 74 pacientes tratados com varfarina.

Para além de -1639 G > A, efectuamos o rastreio de três polimorfismos intrónicos (rs9934438, intrão 1 1173 C > T; rs8050894, intrão 2 g.509+124C; e rs2359612, intrão 2 g.509+837C) e de um polimorfismo 3' UTR (rs7294, 3730 G > A) na população chinesa. Todos os quatro polimorfismos estavam em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo do promotor -1639 (intermarcador D' e valores $r^2 = 1,0$).

Também foram genotipificadas as variantes de CYP2C9 nos grupos chineses. A frequência do CYP2C9*1/*3 foi de 7,3% na população chinesa normal e de 5,4% nos chineses seleccionados aleatoriamente que receberam varfarina. A

variante CYP2C9*2 não foi detectada nos pacientes chineses nem nos indivíduos de referência. Comparativamente com os dados publicados sobre a frequência da variante CYP2C9 nos caucasianos, a população caucasiana apresentou uma frequência das variantes CYP2C9 muito mais elevada do que a população chinesa (aproximadamente 30% contra 7%), se bem que os caucasianos sejam mais resistentes à varfarina. Não foram encontradas outras mutações de sentido incorrecto nos pacientes sensíveis à varfarina, 895 A > G (T299A) e 1145 C > T (P382L) (Quadro 1), em nenhum dos pacientes seleccionados aleatoriamente nem nos indivíduos de referência, sugerindo isso que tais mutações são raras.

EXEMPLO 4

Actividade do promotor de VKORC1

As diferenças entre a sensibilidade à varfarina nos pacientes de genótipos AA e GG poderiam ser explicadas pelas modificações na actividade do promotor de VKORC1. O promotor SNP -1639 estava localizado no segundo nucleótido de uma caixa E (CANNTG) e por tal motivo este polimorfismo poderia alterar a sequência de consenso da caixa E e poderia levar a modificações na actividade do promotor de VKORC1. Para se testar esta hipótese, amplificou-se por PCR o promotor de VKORC1 que abrange a posição -1639, proveniente de pacientes com o genótipo -1639 AA ou GG e efectuou-se a sua clonagem no vector pGL-3. Foi escolhida a célula HepG2 (uma linhagem de células de hepatoma humano) para o ensaio do promotor, uma vez que o VKORC1 é expresso ao nível mais elevado no fígado. Efectuou-se um total de 9 experiências e todas elas levaram a resultados consistentes

(traduzidos na figura 2). O promotor de -1639 G do VKORC1 revelou actividade de luciferase superior (aproximadamente 44% superior) comparativamente com o promotor de -1639 A. O vector básico pGL-3 de controlo não tinha nenhum promotor inserido no local de clonagem múltiplo e revelou uma quantidade desprezável de actividade de luciferase. Assim sendo, a sequência na posição -1639 é importante para a actividade do promotor e uma actividade mais elevada do promotor (v.g., -1639G) está associada a necessidades maiores de doses de varfarina.

EXEMPLO 5

Combinação de VKORC1 -1639 SNP e de variantes de CYP2C9 na dosagem com varfarina

Embora o VKORC1 -1639 SNP por si só possa ser utilizado para se prever a sensibilidade à varfarina, este SNP pode ser combinado facultativamente com outros marcadores genéticos. Por exemplo, a presença simultânea do gene VKORC1 e do gene de CYP2C9 pode ser examinada na dosagem com varfarina. O quadro subsequente ilustra as doses sugeridas de Coumadin para cada haplotipo quando estes genes são considerados simultaneamente:

VKORC1 -1639	Variantes de CYP2C9	Dose sugerida (mg/dia)
GG	*1	5
	*2	3,75
	*3	3,75
AG	*1	3,75
	*2	2,5
	*3	2,5
AA	*1	2,5
	*2	1,25
	*3	1,25

LISTAGEM DAS SEQUENCIAS

<110> Academia Sinica

<120> Variantes genéticas que prevêm a sensibilidade à
varfarina

<130> JB/070217/JH

<140> EP 05855433.8

<141> 2005-12-21

<150> US 60/638,837

<151> 2004-12-21

<150> US 60/679,694

<151> 2005-05-10

<160> 5

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 11190

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

cagaggacaa	catagatagg	ttcggagact	actcagagaa	agggagagag	aatgctaggt	60
tatctttcag	ctgttttagc	tgcttattgt	tccagcttta	gccaccatct	gactgcaatt	120
gtatgagcca	gaaatagcca	ggtaaaattg	tcttcccaaa	ttcctagtgc	acaaaaactg	180
tcagaggctg	ggggcagtg	ctcactcctg	taatccagc	agcacttttg	gaagccagg	240
tgggagaact	gcttgagccc	aggagttaga	ggcaacataa	caacaactca	tctctaata	300
aaaaaaaaa	aaaagaaaga	aaaaggccag	gcacagtggc	tcacgcctgt	aatcccagca	360
cttttaggaag	ccaaggaggg	tggatcatga	ggtcaggagt	ttgagaccag	cctggccaat	420
atggtgaaac	cccgctctta	ctaaaaacac	aaaaatcagc	cacgcatagt	ggctggtgcc	480
tgtaatcaca	gctactcagg	aggctaaggc	aggagaatca	cttgaatccg	ggaggcagag	540
gttgagtgga	gccgagattg	caccactgca	tttcagcctg	ggcagcagag	tgggactgtc	600
tcacattaat	taatttaattg	attaaatgct	agaagaaaat	atggtcaaaa	tcttttataa	660
ctcttgaggt	gaggaaggca	atctcggtc	actacaactt	ccacctcccg	ggttcaaagt	720
attctcctgc	ctcagcctcc	tgagtagctg	ggattacagg	caccaccac	catgcccggc	780
taatttttgt	atttttagta	gagacgaggt	ttcgccatgt	tggccaagct	tgtcttaaac	840
tcctgacctc	aggtgatcca	cccacctcag	cctcccaaat	tgctgggatt	acaggcatga	900
gccaccatgc	cccgccta	tttaaaaatg	tttataaaga	cagagtctta	ccaggtgtgc	960
cagacctgtc	tcaaaactcct	gggctcaagt	cattgtcttg	tctcagcctc	ccaaagtctc	1020
gggactacag	gtgtgcacca	ccacacctgg	ctaattttgt	ttatttttta	tagagtgagg	1080
gtctccctgt	gttgtccagg	gtgtctcaaa	ctcctgggct	caagtgggtc	tcctgctca	1140
gcctcccaaa	gtgctgggat	tataggcata	agccactgca	cctggcccca	gtgtgtgtct	1200
tctgaggcta	agtcataaag	agattgcggc	ttctattttg	cttcctctta	gatcactcat	1260
tctgggggaa	accaacaata	aataacagga	acacaccagg	agatcagaga	aagctgagat	1320
acaggcctaa	tgcccagtc	tctgtattca	tttctaattg	ctgctgtaac	aagttactgc	1380
acatttaattg	atgtaaaaca	acacaaattt	atcttacagt	tctgtagctt	agaagtctga	1440
cagagtctca	ctgggctgaa	atcaagatgt	tgatagttcc	ttcccgtga	ctctagagt	1500
agaatccagt	tctttaccct	ttcttgctt	tagaggccac	ccgtatttat	tagctcacia	1560
tccccttct	ccatcttcaa	accagaaaca	ttgcagctct	ctgtgtcttt	tttctttact	1620
cacatctccc	tctgactttc	ttctgccatc	ctccttcatt	ttttaaggac	ccctgtgggc	1680
caggcatggt	ggcttatgcc	tgtaatccca	gcactttgag	aggcggaggc	aggcgggtca	1740
cctgaggtca	ggagttccag	accagcctgg	ccaacatggc	aaaaccccat	ctccactgaa	1800
aatacaaaaa	ttgggcccag	cacggcggct	cacaccgta	atccccatac	tttgagaggc	1860
tgaggcaggt	ggatcacttg	aggtcaggag	ttcaagacca	gcctggccaa	catggtgaaa	1920

tcccgctctct	actaaaaaaaa	aaaaaaaaatta	caataatttag	tcaggcgtgg	tggccagcac	1980
ctataatccc	agctacttgg	gaggttgagg	cacaagaatt	gcttgaaccc	gagaggggga	2040
ggttgacagt	agctgagatt	gcaccaccgt	actccagcct	ggatgacaga	gcaagactct	2100
gtctcaaaat	aaaaattaag	ataaataata	aaaaataaat	aaaaatcagc	aaattagggc	2160
agggtgtggtg	gtggctcatg	cctgtactcc	cagcactttg	agggtgggaag	gttgcttgaa	2220
accagaagtt	tagaccagcc	tgggaaacaa	agtgaagacc	catctctaca	aaaataaaaa	2280
taaattagcc	agggtgtggtg	ggacgtactt	gtactcctag	ctactagggg	ggctgaggtg	2340
caagaatcgc	ttgaacctgg	gagacggagg	ttgcagtgag	ttatgacagt	gccactacac	2400
tccagcctgg	gtgtcaaggg	tctttgaaaa	aataaacaaa	ataggctggg	cgtggtggct	2460
tacacttgta	atcccagcac	tttgggaggg	tgaggcaggg	agatcacaaa	gtcaggagtt	2520
cgagaccagc	ctggccaaca	cagtgaacc	ccgtctctac	taaaaataca	aaaattagcc	2580
aggcatggtt	gcacgcgcct	gtagtcccaa	ctgctcggga	ggctgaggca	ggagaatggc	2640
ttgaacctgg	gggggggcgg	aagttataat	gagccaagat	tgtgccactg	cactccagcc	2700
taggcaacag	agcgagactc	cgtctcaaaa	ataaaaataa	aaataaatca	atagagcctg	2760
gtatgatggc	tcacgcctat	aatcccagca	ctttgggagg	cccagggtggg	tggatcatct	2820
gaggtcagga	gtttgagacc	agcctgacca	acatggagaa	accccatctc	tactaaaaat	2880
acaaaaaatt	agccaggcgt	ggtggcacat	gcctataatc	ccagctactc	aggagcctga	2940
ggcaggagaa	tcgctttaac	cggggaggtg	gaggttgagg	tgagtcgaga	tagcaccatt	3000
gcattctagc	ctgggcaaca	agagcaaaac	tccatctcaa	aaataaataa	ataaatagat	3060
agataggctg	ggcacggtgg	ctcacgcctg	taatcccagc	actttggggg	gccgaggtgg	3120
gcggatcacc	tgaggtcagg	agttcaagac	cagcctggcc	aatatagcga	aacctgtctc	3180
ctactaaaaa	tttaaaaaat	tagccaggca	tgatggcggg	tgctgtaat	cccagctact	3240
cgggaggctg	aggcaggaga	atctctcgaa	cctggcaggg	ggaggttgca	gtgagccgag	3300
atcacaccat	tgcactccag	ttgggcaaca	agagcgaaac	tccacctcaa	aaacaaaata	3360
aaataaaaata	aaatcaggag	attggtcagc	ttaattccat	ctgcaacctt	aattcccttt	3420
tggccattta	acctatcata	ttcacaaagt	ccagggatcc	atgcagggac	atctttggtg	3480
accattatct	tgtctaccac	actctctaga	agagagtaga	tgtgagaaac	agcatctgga	3540
gaggtgaggag	ccagcaggag	agggaaatat	cacagacgcc	agaggaagag	agttcccaga	3600
agggtaggtg	caacagtaag	ggatccctct	gggaagtcaa	gcaagagaag	acctgaaaaa	3660
caaccattgg	ccgggtgcgg	tggctcacgc	ctataatcct	agcatttttg	gagggccgag	3720
tgggtggatc	acttgaggtc	aggagttaa	gacaagcctg	gccaacatgg	tgaaaccttg	3780
tctctactaa	aaatacaaaa	attagccaga	catggtggca	ggcacctgta	gtccaaacta	3840
cttgggaggc	tgaggcacga	gaaccacttg	aacctgggag	gcggaagttg	cagtgaagcc	3900
agatggcacc	gtgcactcc	agcctggcgg	ccagagtgag	actccgtctc	aaaataagta	3960
aataaataaa	taaataacca	ttgggtctag	cgtcttggtg	acaccagcca	ctaggtgtca	4020
gggcaatgct	ggaggcagca	gctagtatat	ggcgtgggca	gcaaggaaga	agtgaaggaag	4080
tagagactgg	gagtgtagaa	tctttccaaa	aacttgaatg	tggaggggta	gatgggataa	4140
tgccggggaga	ggaggctggt	gaaggacctc	ttagtgaagg	gagattttgt	gctgtttctg	4200
agatgggaaa	gaaaaacaag	ttgcagtgtg	ctgtgggagg	atggagaggt	tgaaggtgtg	4260
ggagagtagg	gtcaccatca	gatgggacgt	ctgtggaagga	gagacctcat	ctggcccaca	4320
gcttggaaag	gagagactga	ctgttgagtt	gatgcaagct	caggtgttgc	caggcggggc	4380
ccatgatagt	agagaggtta	ggatactgtc	aagggtgtgt	gtggccaaag	gagtggttct	4440
gtgaatgtat	gggagaaaag	gagaccgacc	accaggaagc	actggtgagg	caggaccggg	4500
gaggatggga	ggctgcagcc	cgaatggtgc	ctgaaatagt	ttcaggggaa	atgcttgggt	4560
cccgaatcgg	atcgccgtat	tcgctggatc	ccctgatccg	ctggtctcta	ggtcccggat	4620
gctgcaattc	ttacaacagg	acttggcata	gggtaagcgc	aaatgctgtt	aaccacacta	4680
acacactttt	ttttttcttt	tttttttttg	agacagagtc	tcactctgtc	ggcctggctg	4740
gagtgcagtg	gcacgatctc	ggctcactgc	aacctccggc	tccccggctc	aagcaattct	4800
cctgcctcag	cctcccagat	agctgggatt	acaggcatgt	gccaccacgc	ccggctaatt	4860
tttgtatttt	tagttgagat	gggttttcac	catgttggcg	aggctggtct	tgaactcctg	4920
acctcaggtg	atccgccagc	ctcggcctcc	caaagtgcgt	ggattacaag	cgtgagccac	4980
cgtgccccgc	caacagtttt	taaatctgtg	gagacttcat	ttcccttgat	gccttgcagc	5040
cgcgcgcgact	acaactccca	tcatgcctgg	cagccgctgg	ggccgcgatt	ccgcacgtcc	5100
cttaccgcgt	tcactagtcc	cggcattctt	cgtgttttcc	ctaactcgcc	cgtttgacta	5160
gcgccttgga	acagccattt	gggtcgtgga	gtgcgagcac	ggccggccaa	tcgcgcgagtc	5220
agagggccag	gaggggcgcg	gccattcgcc	gcccggcccc	tgcctcgtgg	ctggttttct	5280
ccgcgggcgc	ctcgggcgga	acctggagat	aattgggcagc	acctggggga	gccctggctg	5340
ggtgcccgtc	gctctttgcc	tgacgggctt	agtgtctctg	ctctacgcgc	tgacagtgaa	5400
ggcgggcgcg	gcccgggacc	gggattaccg	cgcgtctctg	gacgtgggca	ccgccatcag	5460
ctgttcgcgc	gtcttctcct	ccagggtgtg	acgggagtg	gaggcgtggg	gcctcggagc	5520

agggcgggcca	ggatgccaga	tgattattct	ggagtctggg	atcgggtgtgc	ccggggaacg	5580
gacacgggggc	tggactgctc	gcgggggtcgt	tgacacagggg	ctgagctacc	cagcgatact	5640
ggtgttcgaa	ataagagtgc	gaggcaaggg	accagacagt	gctggggact	gggattattc	5700
cggggactcg	cacgtgaatt	ggatgccaa	gaataacggt	gaccaggaaa	ggcggggagg	5760
caggatggcg	gtagagattg	acgatggtct	caaggacggc	gcgcaggtga	aggggggtgt	5820
tggcgatggc	tgcgcccagg	aacaagggtg	cccgggtctg	ctgtgcgtga	tggccaggcg	5880
ttagcataat	gacggaatac	agaggaggcg	agtgagtggc	cagggagctg	gagattcttg	5940
ggtccagggc	aaagataatc	tgcccccgac	tcccagttct	tgatgcaaaa	ccgagtgaac	6000
cgttatacca	gccttgccat	tttaagaatt	acttaagggc	cgggcgcggg	ggccactcc	6060
tgtaatccca	gcactttggg	aggccgaggc	ggatggatca	cttgaagtca	ggagttgacc	6120
agcctggcca	acatggtgaa	agcctgtctc	taccaaaaat	agaaaaatta	atcgggcgct	6180
atggcggggtg	ccttaatccc	agctactcgg	gggggctaag	gcaggagaat	cgcttgaacc	6240
cgggaggcg	aggtttcagt	gagccgagat	cgcgccactg	cactccagcc	tgggcagag	6300
tgagactccg	tctcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agagacttac	tttaaggcta	6360
agatgaaaag	cagggcctac	ggagttagcca	cgtccggggc	tgggtctggg	agaggggagg	6420
atagggtcag	tgacatggaa	tcctgacgtg	gccaaagggtg	cccggtgcca	ggagatcatc	6480
gacccttgga	ctaggatggg	aggtcgggga	acagaggata	gccagggtgg	cttcttgga	6540
atcacctttc	tcgggcaggg	tccaaggcac	tgggttgaca	gtcctaacct	ggttccacc	6600
cacccaccct	ctctgccagg	tggggcaggg	gtttcgggct	ggtggagcat	gtgctgggac	6660
aggacagcat	cctcaatcaa	tccaacagca	tattcgggtg	catcttctac	acactacagc	6720
tattgttagg	tgagtggctc	cgccccctcc	ctgcccgcgc	cgccccgcgc	ctcatcccc	6780
ttggtcagct	cagccccact	ccatgcaatc	ttggtgatcc	acacagctga	cagccagcta	6840
gctgctcatc	acggagcgtc	ctgcgggtgg	ggatgtgggg	aggtaactaa	caggagtctt	6900
ttaattgggt	taagtactgt	tagaggctga	agggccctta	aagacatcct	aggtccccag	6960
gttttttggt	tggtgttggt	ttgagacagg	gtctgggctct	gttgcccaaa	gtgaggtcta	7020
ggatgccctt	agtgtgcact	ggcgtgatct	cagttcatgg	caacctctgc	ctccctgccc	7080
aagggtacct	cccaccttag	cctcccaagc	agctggaatc	acaggcgtgc	accactatgc	7140
ccagctaatt	tttgtttttg	tttttttttg	gtagagatgg	tgtctcgcca	tgttgcccag	7200
gctgggtctca	agcaatctgt	ctgcctcagc	ctcccaaaag	gctgggggga	ttacaggcgt	7260
gagctaccat	gccccaccaa	cacccagtt	ttgtggaaaa	gatgccgaaa	ttccttttta	7320
aggagaagct	gagcatgagc	tatcttttgt	ctcatttagt	gctcagcagg	aaaattttgt	7380
tctagtccca	taagaacaga	gagaggaacc	aagggtgtgg	aagacgatgg	cgccccaggc	7440
cttgcgtgatg	ccatatgccg	gagatgagac	tatccattac	cacccttccc	agcaggctcc	7500
cacgctccct	ttgagtcacc	cttcccagct	ccagagaagg	catcactgag	ggaggcccag	7560
caccacggtc	ctggctgaca	catggttcag	acttgccga	tttattttaag	aaattttatt	7620
gctcagaact	ttccctccct	gggcaatggc	aagagcttca	gagaccagtc	ccttggaggg	7680
gacctgttga	agccttcttt	tttttttttt	tttaagaaata	atcttgctct	ggttgcccagg	7740
ctggagtgc	gtggcacaa	catagctcac	tgtaacctgg	ctcaagcgat	cctcctgagt	7800
agctaggact	ataggcatgt	cactgcaccc	agctaatttt	tttttttttt	tttttttttt	7860
ttttgcgaca	tagtctcgct	ctgtcaccag	gctggagtgc	agtggcacga	tcttggtctca	7920
ctgcaacctc	tgcctcccg	gttcaagcaa	ttttcctgcc	tcagcctcct	gagtagctgg	7980
gactacaggc	gcgtgtcacc	acgccagct	aatttttgtta	tttttagtgg	agacagggtt	8040
tcaccatggt	ggctaggatg	gtctcaatct	cttgacctgg	tgatccatcc	gccttggcct	8100
cccaaagtgc	taggattaca	ggcgtgagtc	aacctcaccg	ggcatttttt	ttttgagacg	8160
aagtcttgct	cttgcgtgcc	aagctggaat	gtggtggcat	gatctcggt	cactgcaacc	8220
tccacctcct	aggttcaagc	gattctccac	cttagcctcc	ccagcagctg	ggattacagg	8280
tgcccagcaa	cacacccggc	taatttttgt	atttttatta	gagatggggt	tttgccatgt	8340
tggccaggct	gctctcgaa	tcctaaccct	aggatgacca	ccccattgg	cctcccaaaa	8400
tactgggatt	acaggcatga	gccaccgtgc	ccagctgaat	ttctaaattt	ttgatagaga	8460
tcgggtcttt	ctatgttgcc	caagctggtc	ttgaactcct	agcctaaagc	agtcttccca	8520
cctcggcctc	ccagagtgtt	tggaaatcgt	gcgtaagcca	ccacatctgc	cctggagcct	8580
cttgttttag	agacccttcc	cagcagctcc	tggcatctag	gtagtgcagt	gacatcatgg	8640
agtgttcggg	aggtggccag	tgcctgaagc	ccacacggga	ccctcttctg	ccttgagggt	8700
tgcttgcgga	cacgctgggc	ctctgtcctg	atgctgctga	gctccctggg	gtctctcgct	8760
ggttctgtct	acctggcctg	gatcctgttc	ttcgtgctct	atgatttctg	cattgtttgt	8820
atcaccacct	atgctatcaa	cgtgagcctg	atgtggctca	gtttccggaa	ggtccaagaa	8880
ccccagggca	aggctaagag	gcactgagcc	ctcaacccaa	gccaggctga	cctcatctgc	8940
tttgcttttg	catgtgagcc	ttgcctaagg	gggcatatct	gggtccctag	aaggccctag	9000
atgtggggct	tctagattac	cccctcctcc	tgccataccc	gcacatgaca	atggacccaa	9060
tgtgccacac	gctcgtctct	ttttacaccc	agtgccctctg	actctgtccc	catgggctgg	9120

tctccaaagc	tctttccatt	gccagggag	ggaaggttct	gagcaataaa	gtttcttaga	9180
tcaatcagcc	aagtctgaac	catgtgtctg	ccatggactg	tgggtgctgg	cctccctcgg	9240
tgttgccttc	tctggagctg	ggaaggttga	gtcagaggga	gagtggaggg	cctgctggga	9300
aggggtggtta	tgggtagtct	catctccagt	gtgtggagtc	agcaaggcct	ggggcaccat	9360
tggcccccac	ccccaggaaa	caggctggca	gctcgctcct	gctgcccaca	ggagccaggc	9420
ctcctctcct	gggaaggctg	agcacacacc	tggaagggca	ggctgccctt	ctggttctgt	9480
aaatgcttgc	tgggaagtgc	ttccttgagt	ttaaacttta	ccccctcagt	tgccttatcg	9540
accattccaa	gccagtattg	gtagccttgg	agggtcaggg	ccaggttgtg	aagggttttg	9600
ttttgcctat	tatgccttga	ccacttacct	acatgccaaag	cactgtttta	gaacttgtgt	9660
tggcaggggtg	cagtggctca	cacctgtaat	ccctgtactt	tgggaggcca	aggcaggagg	9720
atcacttgag	gccaggagtt	ccagaccagc	ctggggcaaaa	tagtgagacc	cctgtctcta	9780
caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aattagccag	gcatggtggt	gtatgtacct	atagtcccaa	9840
ctaactcgga	agctggcggg	aagactgctt	gagcccagaa	ggttgaggct	gcagtgaacc	9900
atgatcactg	cactccagcc	tgagcaacag	agcaagaccg	tctccaaaaa	aaaacaaaaa	9960
acaaaaaaaa	acttggttta	acgtgttaaa	ctcgtttaat	ctttacagtg	atttatgagg	10020
tgggtactat	tattatccct	atcttgatga	tagggacaga	gtggctaatt	agtatgcctg	10080
agatcacaca	gctactgcag	gaggctctca	ggatttgaat	ccacctggtc	catctggctc	10140
cagcatctat	atgctttttt	ttttgttggg	ttgtttttga	gacggacttt	cgctcttggt	10200
gtccaggctg	gagtgcattg	gcacaatttc	ggctcaccac	aacctccacc	tcccaggttc	10260
aagtgattct	cctgcctcag	cctccccagt	agctgggatt	acaggcatgc	gccaccaggc	10320
ctggctaatt	ttgtattttt	agtagagaca	gtgtttctct	atgttggtca	ggctggctct	10380
gcactcccga	cctcagggtg	tctgcctgct	ttggcctccc	aaagtgctgg	gattacaggc	10440
gtgagccacc	atgcccggcc	agcatctata	atatatgcta	aaccttacc	acagctgcct	10500
ctgtcttggg	gtcaggggtc	ttgaatggtc	tgggccagcc	tgagttagga	gtgggaagag	10560
gaagaggagg	cacgcgcaa	agtgttcttc	ccgcctgacc	gagtcctctg	cgcttatgag	10620
gaaggtgggc	accgctgtca	ccctgtttcc	caggaagcca	gcaggcccag	ggagatactg	10680
ggatttgcca	aaggctcaca	gcgagcaagc	agcagtgggt	gctggctcct	caccactcag	10740
cctggcacac	actgtctctg	agcagacctg	ggagaaggca	tgtgaaacct	acctagccct	10800
ggctggaaga	gaagtggggg	agtggaaatg	aaaagtgggg	actgggagga	gctgcccacg	10860
tgccctccat	ggttccagga	tggcactttc	atgctgggag	tgagcttgcc	ctgtgccagg	10920
ctgtcattga	gacgtttttc	attcaacaac	tgtttctcag	acaaggcaca	ggcagggttag	10980
ctctcccagg	ccactcaagt	agtaaggaaa	cagattttaa	cccagacaat	ttggctccac	11040
ggctaaggcc	cagagagggg	tggtgacaag	cctagggtca	cacagccaca	gccccagagc	11100
taggaactgc	tggctagggc	aagcagacag	ctgaatccta	gccaaactgga	ggtggagcag	11160
aggtggagcc	aggagagacc	aggtggcctc				11190

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de iniciador utilizada para detectar as variantes no promotor de VKORC1

<400> 2

cagaagggtta ggtgcaacag taa 23

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de iniciador utilizada para detectar as variantes no promotor de VKORC1

<400> 3

cactgcaact tgtttctctt tcc 23 <210> 4

<211> 32

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador directo contendo um local de restrição XhoI

<400> 4

ccgctcgagt agatgtgaga aacagcatct gg 32

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador inverso contendo um local de restrição HindIII

<400> 5

cccaagctta aaccagccac ggagcag 27

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 2006044686 A [0006]
- WO 2005030039 A [0006]
- EP 05855433 A [0060]
- US 60638837 B [0060]
- US 60679694 B [0060]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **Hirsh, J.** Antithrombotic therapy in deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Am. Heart J., 1992, vol. 123, 1115-1122 [0002]
- **Laupacis, A.; Albers, G.; Dalen, J.; Dunn, M.; Feinberg, W.; Jacobson, A.** Antithrombotic therapy in atrial fibrillation. Chest, 1995, vol. 108, 352S-359S [0002]
- **Stein, P.D.; Alpert, J.S.; Copeland, J.; Dalen, J.E.; Goldman, S.; Turpie, A.G.** Antithrombotic therapy in patients with mechanical and biological prosthetic heart valves. Chest, 1995, vol. 108, 371S-379S [0002]

- **Hirsh, J.; Dalen, J.; Anderson, D.R.; Poller, L.; Bussey, H.; Ansell, J.; Deykin, D.** Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*, 2001, vol. 119, 8S-21 S [0002]
- **Loebstein, R.; Yonath, H.; Peleg, D.; Almog, S.; Rotenberg, M.; Lubetsky, A.; Roitelman, J.; Harats, D.; Halkin, H.; Ezra, D.** Interindividual variability in sensitivity to warfarin--Nature or nurture?. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2001, vol. 70, 159-164 [0002]
- **Takahashi, H.; Wilkinson, G.R.; Caraco, Y.; Muszkat, M.; Kim, R.B.; Kashima, T.; Kimura, S.; Echizen, H.** Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003, vol. 73, 253-263 [0002]
- **Zhao, F.; Loke, C.; Rankin, S.C.; Guo, J.Y.; Lee, H.S.; Wu, T.S.; Tan, T.; Liu, T.C.; Lu, W.L.; Lim, Y.T. et al.** Novel CYP2C9 genetic variants in Asian subjects and their influence on maintenance warfarin dose. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004, vol. 76, 210-219 [0002]
- **Yu, H.C.; Chan, T.Y.; Critchley, J.A.; Woo, K.S.** Factors determining the maintenance dose of warfarin in Chinese patients. *QJM*, 1996, vol. 89, 127-135 [0002]
- **Xie, H.G.; Kim, R.B.; Wood, A.J.; Stein, C.M.** Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, vol. 41, 815-850 [0002]
- **Bogousslavsky, J.; Regli, F.** Anticoagulant-induced intracerebral bleeding in brain ischemia. Evaluation in 200 patients with TIAs, emboli from the heart, and progressing stroke. *Acta. Neurol. Scand.*, 1985, vol. 71, 464-471 [0002]

- **Landefeld, C.S.; Beyth, R.J.** Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am. J. Med.*, 1993, vol. 95, 315-328 [0002]
- **Gullov, A.L.; Koefoed, B.G.; Petersen, P.** Bleeding Complications to Long-Term Oral Anticoagulant Therapy. *J. Thromb. Thrombolysis*, 1994, vol. 1, 17-25 [0002]
- **Kaminsky, L.S.; Dunbar, D.A.; Wang, P.P.; Beaune, P.; Larrey, D.; Guengerich, F.P.; Schnellmann, R.G.; Sipes, I.G.** Human hepatic cytochrome P-450 composition as probed by in vitro microsomal metabolism of warfarin. *Drug Metab. Dispos.*, 1984, vol. 12, 470-477 [0002]
- **Rettie, A.E.; Korzekwa, K.R.; Kunze, K.L.; Lawrence, R.F.; Eddy, A.C.; Aoyama, T.; Gelboin, H.V.; Gonzalez, F.J.; Trager, W.F.** Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.*, 1992, vol. 5, 54-59 [0002]
- **Kaminsky, L.S.; de Morais, S.M.; Faletto, M.B.; Dunbar, D.A.; Goldstein, J.A.** Correlation of human cytochrome P4502C substrate specificities with primary structure: warfarin as a probe. *Mol. Pharmacol.*, 1993, vol. 43, 234-239 [0002]
- **Xie, H.G.; Prasad, H.C.; Kim, R.B.; Stein, C.M.** CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2002, vol. 54, 1257-1270 [0002]
- **Kirchheiner, J.; Brockmoller, J.** Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, vol. 77, 1-16 [0002]
- **Furuya, H.; Fernandez-Salguero, P.; Gregory, W.; Taber, H.; Steward, A.; Gonzalez, F.J.; Idle, J.R.** Genetic

polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics*, 1995, vol. 5, 389-392 [0002]

- **Aithal, G.P.; Day, C.P.; Kesteven, P.J.; Daly, A.K.** Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 1999, vol. 353, 717-719 [0002]

- **Higashi, M.K.; Veenstra, D.L.; Kondo, L.M.; Wittkowsky, A.K.; Srinouanprachanh, S.L.; Farin, F.M.; Rettie, A.E.** Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA*, 2002, vol. 287, 1690-1698 [0002]

- **Nasu, K.; Kubota, T.; Ishizaki, T.** Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics*, 1997, vol. 7, 405-409 [0002]

- **Bell, R.G.; Matschiner, J.T.** Warfarin and the inhibition of vitamin K activity by an oxide metabolite. *Nature*, 1972, vol. 237, 32-33 [0002]

- **Wallin, R.; Martin, L.F.** Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J. Clin. Invest.*, 1985, vol. 76, 1879-1884 [0002]

- **Li, T.; Chang, C.Y.; Jin, D.Y.; Lin, P.J.; Khvorova, A.; Stafford, D.W.** Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 2004, vol. 427, 541-544 [0002]

- **Rost, S.; Fregin, A.; Ivaskevicius, V.; Conzelmann, E.; Hortnagel, K.; Pelz, H.J.; Lappegard, K.; Seifried, E.; Scharrer, I.; Tuddenham, E.G. et al.** Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 2004, vol. 427, 537-541 [0002]

- **Harrington, D.J.; Underwood, S.; Morse, C.; Shearer, M.J.; Tuddenham, E.G.; Mumford, A.D.** Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb. Haemost.*, 2005, vol. 93, 23-26 [0002]
- **D'Andrea, G.; D'Ambrosio, R.L.; Di Perna, P.; Chetta, M.; Santacroce, R.; Brancaccio, V.; Grandone, E.; Margaglione, M.** A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*, 2005, vol. 105, 645-649 [0002]
- **Massari, M.E.; Murre, C.** Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.*, 2000, vol. 20, 429-440 [0002]
- **Terai, S.; Aoki, H.; Ashida, K.; Thorgeirsson, S.S.** Human homologue of maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. *Hepatology*, 2000, vol. 32, 357-366 [0002]
- **Bodin, L.; Verstuyft, C.; Tregouet, D.A.; Robert, A.; Dubert, L.; Funck-Brentano, C.; Jaillon, P.; Beaune, P.; Laurent-Puig, P.; Becquemont, L. et al.** Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood*, 2005, vol. 106 (1), 135-140 [0002]
- **Jones, K.A.; Kadonaga, J.T.; Rosenfeld, P.J.; Kelly, T.J.; Tjian, R.** A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell*, 1987, vol. 48, 79-89 [0002]
- **Rieder, M. J.; A. P. Reiner et al.** Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.*, 2005, vol. 352 (22), 2285-93 [0002]

- **Geisen, C.; M. Watzka et al.** VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost*, 2005, vol. 94 (4), 773-9 [0002]
- **Veenstra, D. L.; J. H. You et al.** Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics*, 2005, vol. 15 (10), 687-91 [0002]
- **Sconce, E. A.; T. I. Khan et al.** The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*, 2005, vol. 106 (7), 2329-33 [0002]

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para prever o intervalo de dosagem de uma varfarina para um paciente humano, o qual compreende:

investigar o nucleótido na posição 3673 da SEQ ID NO:1 do paciente;

determinar se o paciente é sensível ou resistente à varfarina, com base no nucleótido da posição 3673; em que o genótipo homozigótico AA, heterozigótico AG e homozigótico GG na posição 3673 indica, respectivamente, que o paciente é sensível, medianamente sensível e resistente à varfarina; e

prever um intervalo de dosagem de varfarina, com base na sensibilidade ou resistência do paciente à varfarina.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência é investigada utilizando um oligonucleótido que hibrida especificamente com o promotor do gene VKORC1.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o oligonucleótido hibrida especificamente pelo menos com 6 nucleótidos que abrangem a posição 3673 da SEQ ID NO: 1.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência é investigada utilizando ADN preparado a partir do sangue periférico do indivíduo.

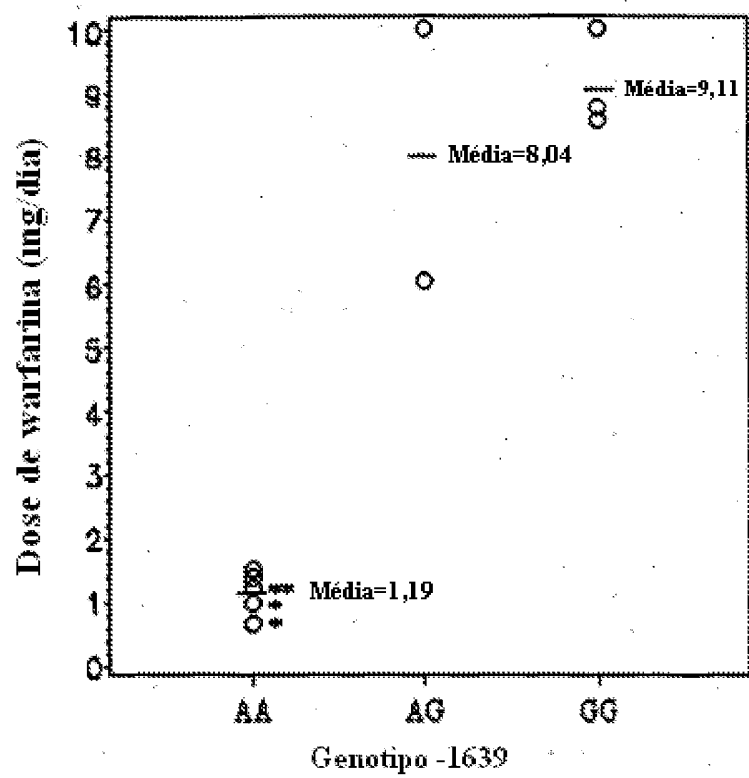
5. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o indivíduo é um asiático.

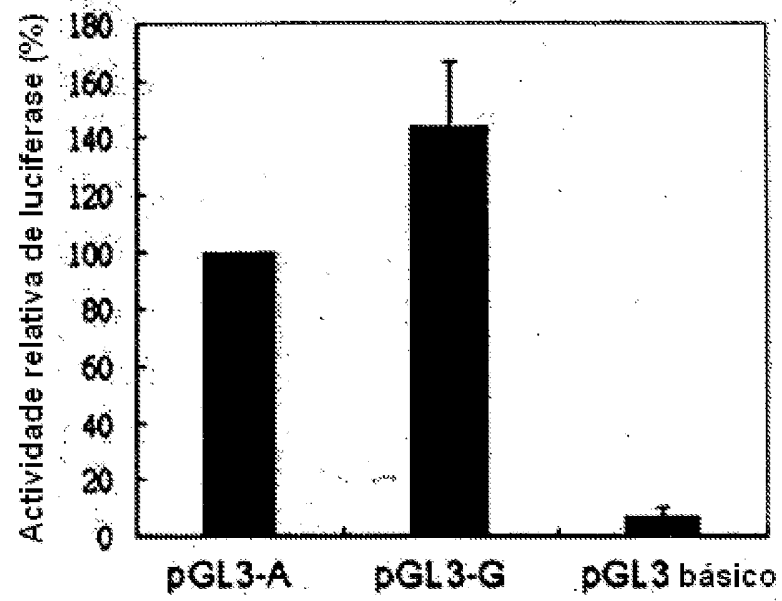
6. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o indivíduo é um caucasiano.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o indivíduo é um africano, um afroamericano ou um hispânico.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1, o qual consiste também em examinar a sequência do gene CYP2C9 e prever um intervalo de dosagem da varfarina para o paciente, com base no nucleótido na posição 3673 da SEQ ID NO:1 e da sequência do gene de CYP2C9.

Lisboa, 3/09/2010

**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

```

1  cagaggacaa catagatagg ttccggagact actcagagaa agggagagag aatgctaggt
61  tatcttttcag ctgtttttagc tgctttattgt tccagcttta gccaccatct gactgcaatt
121 gtatgagcca gaaatagcca ggtaaaattg tcttcccaa ttccctagtgc acaaaaaactg
181 tcagaggctg ggggcagtggt ctcaactctg taatcccagc agcacttttg gaagccaggg
241 tgggagaact gcttgagccc aggagttaga ggcaacataa caacaactca tctctaataga
301 aaaaaaaaaa aaaagaaaaga aaaaggccag gcacagtggc tcacgcctgt aatcccagca
361 ctttaggaag ccaaggaggg tggatcatga ggtcaggagt ttgagaccag cctggccaat
421 atgggtgaaac cccgtctcta ctaaaaaacac aaaaatcagc cagcatagt ggctgggtgcc
481 tgtaatcaca gctactcagg aggctaaggc aggagaatca cttgaatccg ggaggcagag
541 gttgcagtga gccgagattg caccactgca tttcagcctg ggcagcagag tgggactgtc
601 tcacattaat taattaattg attaaatgct agaagaaaat atggtcaaaa tcttttataa
661 ctcttgaggt gaggaaggca atctcggtc actacaactt ccacctccg ggttcaaatg
721 attctcctgc ctacgcctcc tgagttagct ggattacagg caccaccac catgcccggc
781 taatttttgt attttttagt gagacgaggt ttcgccatgt tggccaagct tgtcttaaac
841 tectgacctc aggtgatcca cccacctcag cctcccaaat tgctgggatt acaggcatga
901 gccacctgc cccgcctaatt tttaaaaatg tttataaaga cagagtctta ccacgttgtc
961 cagacctgtc tcaaaactct gggctcaagt cattgtcttg tetcagect ccaaagttct
1021 ggggatacag gtgtgcacca ccacacttgg ctaattttgt ttatttttta tagagtgagg
1081 gtctccctgt gttgtccagg gtgtctcaaa ctctggggt caagtgttcc tctgctca
1141 gcctcccaaa gtgtgggat tataggcata agccactgca cctggcccca gtgtgtgtct
1201 tctgaggcta agtcataaag agattgcggc ttctattttg ctctctcta gatcactcat
1261 tctgggggaa accaacaata aataacagga acacaccagg agatcagaga aagctgagat
1321 acaggcctaa tgcccagttc tctgtattca tttctaattg ctgctgtaac aagttactgc
1381 acatttaatt atgtaaaaca acacaaatct atcttacagt tctgtagctt agaagtctga
1441 cagagtctca ctgggctgaa atcaagatgt tgatagttcc ttcccggtga ctctagagtg
1501 agaatccagt tctttacctt ttcttgctt tagaggccac cctattttat tagctcacia
1561 tccccctctt ccatcttcaa accagaaaca ttgcagctct ctgtgtcttt tttctttact
1621 cacactctcc tctgaacttc ttctgccatc ctcttctatt ttttaaggac cctgtggggc
1681 caggcatgggt ggcttatgcc tgtaatccca gcactttgag agggcgaggc agggcggtca
1741 cctgagggtca ggagttccag accagcctgg ccaacatggc aaaaccccat ctccactgaa
1801 aatacaaaaa ttgggcccagg cacggcggtt cacaccgta atccccatac tttgagaggc
1861 tgaggcaggt ggatcacttg aggtcaggag ttcaagacca gcctggccaa catggtgaaa
1921 tcccgctctt actaaaaaaa aaaaaaatta caataattag tcaggcgttg tggccagcac
1981 ctataatccc agctacttgg gaggttgagg cacaagaatt gcttgaacce gagaggggga
2041 ggttgacagt agctgagatt gcaccaccgt actccagcct ggatgacaga gcaagactct
2101 gtctcaaaat aaaaattaag ataaataata aaaaataaat aaaaatcagc aaattaggcc
2161 aggtgtgggt gtggctcatg cctgtactcc cagcactttg aggtgggaag gttgcttgaa
2221 accagaagtt tagaccagcc tgggaacaaa agtgagacct catctctaca aaaataaaaa
2281 taaatttagc aggtgtgggt ggacgtactt gtactcctag ctactagggg gctgaggtg
2341 caagaatcgc ttgaacctgg gagacggagg ttgcagttag ttatgacagt gccactacac
2401 tccagcctgg gtgtcaagggt tctttgaaaa aataaacaaa ataggctggg cgtggtggct
2461 tacacttgta atcccagcac tttgggaggc tgaggcaggc agatcacaaa gtcaggagtt
2521 cgagaccagc ctggccaaca cagtgaacc ccgtctctac taaaaataca aaaattagcc
2581 aggcattggt gcacgcgcct gtagtcccaa ctgctcggga ggctgaggca ggagaatggc
2641 ttgaacctgg gggggggcgg aagttataat gagccaagat tgtgccactg cactccagcc
2701 taggcaacag agcgagactc cgtctcaaaa ataaaaataa aaataaatca atagagcctg
2761 gtatgatggc tcacgcctat aatcccagca ctttgggagg cccagggtgg tggatcatct
2821 gaggtcagga gtttgagacc agcctgacca acatggagaa acccatctc tactaaaaat
2881 acaaaaaatt agccaggcgt ggtggcacat gcctataatc ccagctactc agggacctga
2941 ggcaggagaa tcgctttaac cggggagggt gaggttgagg tgagtcgaga tagcaccatt

```

FIGURA 3 (FOLHA 1 DE 4)

```

3001 gcattctagc ctgggcaaca agagcaaac tccatctcaa aaataaataa ataaatagat
3061 agataggctg ggcacggctg ctcacgcctg taatcccagc actttgggag gccgaggtgg
3121 gcggatcacc tgaggtcagg agttcaagac cagcctggcc aatatagcga aacctgtct
3181 ctactaaaaa tttaaaaaat tagccaggca tgatggcggg tgcctgtaat cccagctact
3241 cgggaggctg aggcaggaga atctctcgaa cctggcaggc ggaggttgca gtgagccgag
3301 atcacaccat tgcactccag ttgggcaaca agagcgaaac tccacctcaa aaacaaaata
3361 aaataaaata aaatcaggag attggtcagc ttaattccat ctgcaacctt aattcccttt
3421 tggccattta acctatcata ttcacaagtt ccagggatcc atgcagggac atctttggtg
3481 accattattc tgtctaccac actctctaga agagagtaga tgtgagaaac agcatctgga
3541 gagggaggag ccagcaggag agggaaatat cacagacgcc agagggaagag agttcccaga
3601 agggtaggtg caacagtaag ggatccctct gggaaagtcaa gcaagagaag acctgaaaaa
3661 caaccattgg cgggtgctg tggctcacgc ctataatcct agcatttttg gaggccgagg
3721 tgggtggatc acttgaggtc aggagtttaa gacaagcctg gccacatgg tgaaacctg
3781 tctctactaa aaatacaaaa attagccaga catggtggca ggcacctgta gtccaaacta
3841 cttggggaggc tgaggcacga gaaccacttg aacctggag ggggaagttg cagttagccg
3901 agatggcacc gctgcactcc agcctgggag acagagttag actccgtctc aaaataagta
3961 aataaataaaa taaataacca ttgggtctag cgtcttggtg acaccagcca ctagggtgca
4021 gggcaatgct ggaggcagca gctagtttat ggcgtgggca gcaagggaag agtgagggaag
4081 tagagactgg gagtgtagaa tctttccaaa aacttgaatg tggaggggta gatgggataa
4141 tgccgggaga ggaggctggt gaaggacctc ttagtgaagg gagatttgtt gctgtttctg
4201 agatgggaaa gagaaacaag ttgcagtgtg gatggggagg atggagaggt tgaagggtga
4261 ggagagatgg gtcaccatca gatgggacgt ctgtgaagga gagacctcat ctggcccaca
4321 gcttggaaaag gagagactga ctgttgagtt gatgcaagct caggtgtgtc caggcgggag
4381 ccatgatagt agagaggtta ggatactgtc aagggtgtgt gtggccaaag gagtggttct
4441 gtgaatgtat gggagaaagg gagaccgacc accaggaagc actggtgagg caggaccagg
4501 gaggatggga ggtgcagcc cgaatggtgc ctgaaatagt ttcaggggga atgcttgggt
4561 ccggaatcgg atcgcgatc cctgatccg ctggtctcta ggtcccggtt
4621 gctgcaattc ttacaacagg acttggcata gggtaagcgc aaatgctglt aaccacacta
4681 acacactttt ttttttcttt ttttttttg agacagagtc tcaactctgtc ggcctggctg
4741 gagtgcagtg gcacgatctc ggtcactgtc aacctccggc tccccggctc aagcaattct
4801 cctgctcag cctcccgagt agctgggatt acaggcatgt gccaccagc cggctaatt
4861 tttgtatttt tagttgagat ggggtttcac catgttggcg aggtggtct tgaactcctg
4921 acctcaggta atccgcagc ctcgccctcc caaagtgtg ggattacaag cgtgagccac
4981 cgtgcccggc caacagtttt taaatctgtg gagacttcat ttcccttgat gccttgacgc
5041 cgcgcgact acaactccca tcatgctggt cagccgctgg ggccgagatt ccgcacgtcc
5101 cttaccggct tcactagtcc cggcattctt cgtgtttttc ctaactcgcc cgttgaacta
5161 gcgccctgga acagccattt gggctgtgga gtgcgagcac ggcgggcaa tcgcccagtc
5221 agagggccag gagggcgcg gccattcgcc gcccgcccc tgctcgtgg ctggtttct
5281 ccgcgggcgc ctcgggcgga acctggagat aatgggcagc acctggggga gccctggctg
5341 ggtgcggtc gctctttgcc tgacgggctt agtgctctcg ctctacgcgc tgcacgtgaa
5401 ggcggcgcg gcccgggacc gggattaccg cgcgctctgc gacgtgggca ccgccatcag
5461 ctgttcgcg gtcttctcct ccagggtgtc acgggagtg gaggcgtgg gctcggagc
5521 agggcgggca ggatgccaga tgattattct ggagtctgg atcgtgtgc cgggggaacg
5581 gacacggggc tggactgtc gcggggtcgt tgcacagggg ctgagctacc cagcgatact
5641 ggtgttcgaa ataagagtgc gaggcaagg accagacagt gctggggact gggattattc
5701 cggggactcg cacgtgaatt ggatgccaa gaataacggt gaccaggaag ggcggggagg
5761 caggatggcg gtagagattg acgatggtct caaggacggc gcgcagggtg aggggggtgt
5821 tggcgatggc tgcgcccagg aacaaggtgg ccgggtctgg ctgtgcgtga tggccaggcg
5881 ttagcataat gacggaatac agaggaggcg agtgagtggc cagggaagctg gagattctgg
5941 ggtccagggc aaagataatc tgccccgac tcccagctctc tgatgcaaaa ccgagtgaac

```

FIGURA 3 (FOLHA 2 DE 4)

```

6001 cgttatacca gccttgccat ttttaagaatt acttaagggc cgggcgcggg ggcccactcc
6061 tgtaatecca gcactttggg aggccgaggg ggatggatca cttgaagtca ggagttgacc
6121 agcctggcca acatggtgaa agcctgtctc taccaaaaat agaaaaatta atcgggcgct
6181 atggcggggtg ccttaatccc agctactcgg ggggggctaag gcaggagaat cgcttgaacc
6241 cgggaggcgg aggtttcagt gagccgagat cgcgccactg cactccagcc tgggcccagag
6301 tgagactcgg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agagacttac ttaaggtcta
6361 agatgaaaag cagggccctac ggagtagcca cgtccggggc tgggtctgggg agaggggagg
6421 atagggtcag tgacatggaa tcctgacgtg gccaaagggtg cccgggtgcca ggagatcatc
6481 gacccttgga ctaggatggg aggtcggggg acagaggata gccaggtggg cttcttgga
6541 atcacctttc tcgggcaggg tccaaggcac tgggttgaca gtccaaacct ggtccacccc
6601 caccaccacc ctctgccagg tggggcaggg gtttcgggct ggtggagcat gtgctgggac
6661 aggacagcat cctcaatcaa tccaacagca tattcgggtg catcttctac acactacage
6721 tattgttagg tgagtggctc cgccccctcc ctgcccgcgc cgccccgcgc cgcccccccc
6781 ttggtcagct cagccccact ccctgcaatc ttggtgatcc acacagctga cagccagcta
6841 gctgctcatc acggagcgtc ctgcccgggtg ggatgtgggg aggttaactaa caggagtctt
6901 ttaattgggt taagtactgt tagaggctga agggccctta aagacatcct aggtcccccag
6961 gttttttgtt tgttgttgtt ttgagacagg gtctggctct gttgcccata gtgaggtcta
7021 ggatgccctt agtgtgcact ggcgtgatct cagttcatgg caacctctgc ctccctgccc
7081 aagggatcct cccaccttag cctcccaagg agctggaatc acaggcgtgc accactatgc
7141 ccagctaatt tttgtttttg tttttttttg gtagagatgg tgtctcgcca tgttggcccag
7201 gctggtctca agcaatctgt ctgcctcagc ctcccaaaag gctggggggga ttacaggcgt
7261 gagctaccat gccccaccaa caccacagtt ttgtggaaaa gatgccgaaa ttccttttta
7321 aggagaagct gagcatgagc tatcttttgt ctcatctagt gctcagcagg aaaatttgtta
7381 tctagtccca taagaacaga gagaggaaac aagggagtg gacacgatgg cgcgccaggc
7441 cttgctgatg ccataatgcc gagatgagac tatccattac caccctcccc agcaggctcc
7501 cagcgtccct ttgagtcacc ctcccgagct ccagagaagg catcactgag ggaggcccag
7561 caccacgggc ctggtgaca catggttcag acttgccga tttatttaag aaattttatt
7621 gctcagaact tccctccct gggaatggc aagagcttca gagaccagtc ccttggaggg
7681 gacctgttga agccttcttt tttttttttt ttaagaaata atcttgcctc gttgcccagg
7741 ctggagtga gtggcacaat catagctcac tgtaacctgg ctcaagcgat cctcctgagt
7801 agctaggact ataggcatgt cactgcaccc agctaatttt tttttttttt tttttttttt
7861 ttttgcgaca tagtctcgct ctgtcaccag gctggagtgc agtggcagca tcttggctca
7921 ctgcaacctc tgcctcccgg gtccaagcaa ttttcctgcc tcagcctcct gagtagctgg
7981 gactacaggg cgtgtcacc acgcccagct aatttttgtt tttttagtgg agacagggtt
8041 tcaccatgtt ggctaggatg gtctcaatct cttgacctgg tgatccatcc gccttggcct
8101 cccaaagtgc taggattaca ggcgtgagtc aacctcaccg ggcatttttt ttttgagacg
8161 aagctcttgt cttgttgcct aagctggaat gtggtggcat gatctcggt cactgcaacc
8221 tccacctcct aggttcaagg gattctccac cttagcctcc ccagcagctg ggattacagg
8281 tgcccatcaa cacacccggc taatttttgt atttttatta gagatggggg tttgcatgt
8341 tggccaggct gctctcgaa tcctaacctc aggtgatcca ccccatggg cctcccaaaa
8401 tactgggatt acaggcatga gccaccgtgc ccagctgaat ttctaaattt ttgatagaga
8461 tcgggtcttt ctatgttgcc caagctggtc ttgaactcct agcctaaagc agtcttccca
8521 cctcgccctc ccagagtgtt tggaaatcgt gctgaagcca ccacatctgc cctggagcct
8581 cttgttttag agacccttcc cagcagctcc tggcatctag gtagtgcagt gacatcatgg
8641 agtgttcggg aggtggccag tgcctgaagc ccacaccgga ccctctctct ccttgcaggt
8701 tgcttgccga cacgtgggc ctctgtcctg atgtgtctga gctccctggg gtctctcgct
8761 ggttctgtct acctggcctg gatcctgttc ttggtgtct atgatttctg cattgtttgt
8821 atcacacct atgctatcaa cgtgagcctg atgtggctca gtttcgggaa ggtccaagaa
8881 ccccgaggca aggctaagag gcactgagcc ctcaacccaa gccaggtga cctcatctgc
8941 tttgttttgg catgtgagcc ttgcctaagg gggcatatct gggccctag aaggccctag

```

FIGURA 3 (FOLHA 3 DE 4)

```

9001 atgtggggct tctagattac cccctcctcc tgccataccc gcacatgaca atggaccaaa
9061 tgtgccacac gctcgtctct ttttacacce agtgccctctg actctgtccc catgggctgg
9121 tctccaaagc tctttccatt gcccagggag ggaagggtct gagcaataaa gtttcttaga
9181 tcaatcagcc aagtctgaac catgtgtctg ccatggactg tgggtgctggg cctccctcgg
9241 tgttgccctc tctggagctg ggaaggggtga gtcagagggg gagtggaggg cctgctggga
9301 aggggtggta tgggtagtct catctccagt gtgtggagtc agcaaggcct ggggcaccat
9361 tggcccccac ccccaggaaa caggctggca gctcgtcctt gctgcccaca ggagccaggc
9421 ctctctcctt ggggaaggctg agcacacacc tgggaaggga ggctggcctt ctggttctgt
9481 aaatgcttgc tgggaagttc ttcccttgagt ttaactttaa cccctccagt tgccttatcg
9541 accattccaa gccagtattg gtagccttgg agggtcaggg ccaggttgtg .aagggttttg
9601 ttttgccat tatgcctga ccacttacct acatgccaaag cactgtttaa gaacttgtgt
9661 tggcaggggt cagtggctca cactgtaat cctgtactt tgggaggcca aggcaggagg
9721 atcacttgag gccaggagt ccagaccage ctgggcaaaa tagtgagacc cctgtoteta
9781 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aattagccag gcatggtggt gtatgtacct atagtcccaa
9841 ctaatcggga agctggcggg aagactgctt gagccagaa ggttgaggct gcagttagcc
9901 atgatcactg cactccagcc tgagcaacag agcaagaccg tctccaaaaa aaaacaaaaa
9961 aaaaaaaaaa acttgtgtta acgtgttaaa ctggtttaat ctttacagtg atttatgagg
10021 tgggtactat tattatccct atcttgatga tagggacaga gtggctaatt agtatgcctg
10081 agatcacaca gctactgcag gaggctctca ggatttgaat ccacctggtc catctggctc
10141 cagcatctat atgctttttt ttttggttgt ttgttttga gacggacttt cgtcttggtt
10201 gtccaggctg gagtgcattg gcacaatttc ggctcaccac aacctccacc tcccaggttc
10261 aagtgattct cctgctcag cctcccgagt agctgggatt acaggcatgc gccaccaggc
10321 ctggctaatt ttgtattttt agtagagaca gtgtttctct atgttggtca ggctggcttc
10381 gcactcccga cctcaggtga tctgcctgct ttggcctccc aaagtgtctg gattacaggc
10441 gtgagccacc atgcccggcc agcatctata atatatgcta aaccttacc acagctgctt
10501 ctgtcttggg gtcagggttc ttgaatggtc tgggccagcc tgagttagga gtgggaagag
10561 gaagaggagg cacgcgcaa agtgttcttc ccgctgacc gactcctctg cgctatgag
10621 gaagggtggc accgctgtca ccctgtttcc cagggaagcca gcaggcccag ggagatactg
10681 ggatttgcca aaggctcaca gcgagcaagc agcagtgggt gctggctcct caccactcag
10741 cctggcacac actgtctctg agcagacctg ggagaaggca tgtgaaaccc acctagcctt
10801 ggctggaaga gaagtggggg agtggaatg aaaagtgggg actgggagga gctgcccacg
10861 tgccctccat ggttccagga tggcactttc atgctgggag tgagcttgcc ctgtgccagg
10921 ctgtcattga gacgttttcc attcaacaac tgtttctcag acaaggcaca ggcaggttag
10981 ctctcccagg ccactcaagt agtaaggaaa cagattttaa cccagacaat ttggctccac
11041 ggctaaggcc cagagagggg tggtgacaag cctagggtca cacagccaca gcccragagc
11101 taggaactgc tggctagggc aagcagacag ctgaatccta gccactgga ggtggagcag
11161 aggtggagcc agggagacc aggtggcctc

```

FIGURA 3 (FOLHA 4 DE 4)