

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.09.29	(73) Titular(es): NOVARTIS AG	
(30) Prioridade(s): 2002.09.30 US 415123 P	LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL	CH
(43) Data de publicação do pedido: 2005.07.06	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.03.17	SRIDHAR KUDARAVALLI	US
122/2008	MIHAEL HRISTOS POLYMERPOULOS	US
	ROSARELIS TORRES	US
	CURT DOUGLAS WOLFGANG	US
	(74) Mandatário:	
	ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA PREVER AUMENTOS DE COLESTEROL DURANTE TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA**

(57) Resumo:

RESUMO

**"MÉTODOS PARA PREVER AUMENTOS DE COLESTEROL DURANTE TERAPIA
IMUNOSSUPRESSORA"**

Este invento proporciona métodos para prever o grau de aumento dos níveis séricos de colesterol em doentes tratados com medicação imunossupressora. Este invento também proporciona estratégias de tratamento baseadas nestas previsões e estojos ("kits") para executar estes métodos.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA PREVER AUMENTOS DE COLESTEROL DURANTE TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA"

Fundamento do invento

Campo do invento

O presente invento pertence às áreas da farmacologia e da medicina e proporciona métodos para determinar quais os doentes que desenvolverão níveis elevados de colesterol sérico durante o tratamento com um fármaco imunossupressor. Em particular, este invento está relacionado com a utilização de análise genómica para identificar doentes em risco de desenvolverem níveis aumentados de colesterol durante a terapia com fármacos imunossupressores e métodos para determinar estratégias óptimas de tratamento para estes doentes.

Descrição da técnica relacionada

Os fármacos imunossupressores possuem muitas aplicações importantes na medicina moderna. Estes fármacos são usados para suprimir a rejeição de órgãos transplantados, incluindo corações, pulmões e rins e para prolongar a vida útil do órgão transplantado. Ainda, os fármacos

imunossupressores são usados para tratar uma larga variedade de outras doenças, tais como doenças auto-imunes, miocardite e artrite reumatóide. No entanto, os fármacos imunossupressores possuem numerosos e por vezes graves efeitos secundários, os quais incluem a indução de cancro e linfomas e a produção de uma variedade de efeitos tóxicos em órgãos internos, tais como o rim.

Devido ao efeito tóxico dos fármacos imunossupressores, tem havido um grande esforço para desenvolver alternativas menos tóxicas e encontrar fármacos cujo mecanismo de acção difere do de outros fármacos imunossupressores, de modo a que possam ser usadas combinações sinérgicas com menos efeitos secundários globais.

Recentemente, observou-se que um antibiótico anti-fúngico, anti-tumoral e imunossupressor, designado rapamicina (também conhecido como sirolimus e RAPAMUNE™) é eficaz na inibição da rejeição de enxertos. A rapamicina possui um mecanismo de actuação que é único e marcadamente diferente da de outros fármacos imunossupressores. A rapamicina e os seus derivados, tais como everolimus (CERTICAN™) (RAD), actuam através da inibição das vias bioquímicas envolvidas na progressão da fase G1-S das células T activadas, numa forma dependente de Ca^{2+} . Ver Schuler *et al.*, Transplantation, Vol. 64, pp. 36-42 (1997). Nesta forma, os derivados de rapamicina tais como everolimus bloqueiam a transdução de sinal por citocinas em lugar de bloquearem a produção de citocinas, como no caso

de outros fármacos imunossupressores tais como a ciclosporina.

A rapamicina e os seus derivados e o ácido micofenólico são fármacos imunossupressores eficazes, no entanto, nalguns doentes a administração destes fármacos causa aumentos do colesterol e dos triglicéridos séricos, *i.e.*, hipercolesterolemia e hiperlipidemia. Ambas as condições são factores de risco para a doença das artérias coronárias (CAD) e para a aterosclerose em geral, especialmente em doentes diabéticos.

A própria hipercolesterolemia é uma condição comum e pode ser tratada com várias classes de fármacos. Estas incluem os inibidores da redutase de HMG-CoA ou as chamadas estatinas, as resinas que ligam ao ácido biliar e o ácido nicotínico.

Radeau *et al.* (Nephron (2000) 84:333-341) descreve o aumento dos efeitos de um polimorfismo TaqIB no gene CETP (alelos B1, B2) nos níveis de HDL-C em 78 recipientes de transplante renal que receberam um tratamento imunossupressor.

Níveis aumentados de colesterol sérico durante o tratamento com um fármaco imunossupressor, como seja rapamicina ou seus derivados incluindo, mas não estando limitado a everolimus (CERTICAN™) (RAD), ou com ácido micofenólico, é um efeito secundário adverso. Isto é

especialmente verdadeiro para os doentes de transplantes de órgãos, uma vez que estes doentes necessitam de tratamento a longo prazo (geralmente para o resto da vida). O aumento nos níveis do colesterol sérico varia largamente de doente para doente e antes do presente invento não era possível prever quais os doentes que desenvolveriam estes aumentos. Assim, existe a necessidade de métodos para prever quais os doentes que sofrerão aumentos do colesterol sérico quando os fármacos imunossupressores, tais como rapamicina e seus derivados ou ácido micofenólico, são administrados a doentes, especialmente para uso a longo prazo.

Sumário do invento

O presente invento ultrapassa este problema ao proporcionar um método para determinar o grau do aumento de colesterol sérico, que ocorrerá num doente durante o tratamento com uma medicação imunossupressora, compreendendo a determinação, para as duas cópias do gene IL-1 β presente no doente, da identidade de um par de nucleótidos seleccionado do grupo consistindo no par de nucleótidos do local polimórfico -511 C \rightarrow T (na posição 1423 da sequência X04500) do gene IL-1 β e classificando o doente num grupo de aumento elevado do colesterol se ambos os pares forem AT, classificando o doente num grupo de aumento intermédio de colesterol se um dos pares for AT e o outro par for GC e classificando o doente num grupo de aumento baixo do colesterol se ambos os pares forem GC; assim como do par de nucleótidos no local polimórfico -31 T \rightarrow C (posição 1903 da

sequência X04500) do gene IL-1 β e classificando o doente num grupo de aumento elevado de colesterol se ambos os pares forem GC, classificando o doente num grupo de aumento intermédio do colesterol se for um par AT e o outro par for GC e classificando o doente num grupo de aumento baixo de colesterol se ambos os pares forem AT.

Ainda, é descrito um método para tratar um doente com uma medicação imunossupressora compreendendo: determinação para as duas cópias do gene IL-1 β presente no doente da identidade do par de nucleótidos no local polimórfico -511 C \rightarrow T (na posição 1423 da sequência X04500) do gene IL-1 β ; e tratando o doente com a medicação de imunossupressão se ambos os pares forem GC e usando um tratamento alternativo se um par for AT e o outro par for GC ou se ambos os pares forem AT. A medicação imunossupressora pode ser seleccionada da lista na Tabela 2 e pode ser everolimus. Ainda, o tratamento alternativo pode compreender a adição de uma medicação que baixe o colesterol escolhida de entre as da lista da Tabela 1.

Ainda, é descrito um método para determinar o grau de aumento do colesterol sérico que ocorrerá num doente durante o tratamento com uma medicação imunossupressora compreendendo: determinação, para as duas cópias do gene IL-1 β presente no doente, da identidade do par de nucleótidos no local polimórfico -31 T \rightarrow C (posição 1903 da sequência X04500) do gene IL-1 β ; e classificando o doente num grupo de aumento elevado de colesterol se ambos os

pares forem CG, classificando o doente num grupo de aumento intermédio do colesterol se for um par AT e o outro par for GC e classificando o doente num grupo de aumento baixo de colesterol se ambos os pares forem AT.

Ainda, é descrito um método para tratar um doente com uma medicação imunossupressora compreendendo: determinação, para as duas cópias do gene IL-1 β presente no doente, da identidade do par de nucleótidos no local polimórfico -31 T→C (posição 1903 da sequência X04500) do gene IL-1 β ; e tratamento do doente com a medicação de imunossupressão se ambos os pares forem AT e usando o tratamento alternativo se um dos pares for AT e o outro par for GC ou se ambos os pares forem CG. A medicação imunossupressora pode ser seleccionada da lista na Tabela 2 e pode ser everolimus. Ainda, o tratamento alternativo pode compreender a adição de uma medicação que baixe o colesterol escolhida de entre as apresentadas na Tabela 1.

Ainda, é descrito um estojo ("kit") para determinação do par de nucleótidos no local polimórfico -511 no gene IL-1 β num doente compreendendo: um recipiente com pelo menos um reagente específico para a detecção da natureza do par de nucleótidos no local polimórfico -511 do gene IL-1 β ; e instruções para as opções de tratamento recomendadas baseadas na natureza do referido par de nucleótidos.

É ainda descrito um estojo ("kit") para determinação do par de nucleótidos no local polimórfico -511 no

gene IL-1 β num doente compreendendo: um recipiente com pelo menos um reagente específico para a detecção da natureza do par de nucleótidos no local polimórfico -31 do gene IL-1 β ; e instruções para as opções de tratamento recomendadas baseadas na natureza do referido par de nucleótidos.

É ainda descrito um estojo ("kit") para determinação do par de nucleótidos no local polimórfico -31 no gene IL-1 β num doente, compreendendo: um contentor com pelo menos um reagente específico para a detecção da natureza do par de nucleótidos no local polimórfico -31 do gene IL-1 β ; e instruções para opções de tratamento recomendadas baseadas na natureza do referido par de nucleótidos.

É ainda descrito um método para determinação do grau de aumento do colesterol sérico que ocorrerá num doente durante o tratamento com uma medicação imunossupressora, compreendendo a determinação, para as duas cópias do gene IL-1 β do doente, do haplotipo relativo ao gene IL-1 β . O termo "haplotipo relativo ao gene IL-1 β " deverá referir-se ao haplotipo consistindo na combinação dos polimorfismos nas posições -511 e -31 do gene IL-1 β . O doente deverá ser classificado num grupo de aumento elevado de colesterol se ambos os cromossomas possuírem o haplotipo "colesterol elevado", *i.e.*, C em vez de T no local -511 e T em vez de C no local -31 do gene IL-1 β e o doente será classificado num grupo de aumento intermédio de colesterol se um dos cromossomas possuir o haplotipo "colesterol elevado" e o outro possuir o haplotipo "colesterol baixo" e

o doente será classificado num grupo de aumento baixo do colesterol se ambos os cromossomas possuírem o haplotipo "colesterol baixo", *i.e.*, C no local -511 e T no local -31.

Ainda, descreve-se um método para tratar um doente com uma medicação imunossupressora, compreendendo a determinação, para os dois cromossomas contendo o gene IL-1 β do doente, do haplotipo relativo ao gene IL-1 β e tratamento do doente com a medicação imunossupressora se ambos os cromossomas possuírem o haplotipo "colesterol baixo" ou se um cromossoma possuir o haplotipo "colesterol baixo" e o outro possuir o haplotipo "colesterol elevado" e utilização de tratamento alternativo se ambos os cromossomas possuírem o haplotipo "colesterol elevado". A medicação imunossupressora pode ser seleccionada da lista na Tabela 2 e pode consistir em everolimus. O tratamento alternativo pode compreender a adição de uma medicação que baixe o colesterol, escolhida da apresentada na Tabela 1.

Outros métodos de determinação da identidade do par de nucleótidos no local -511 e -31 do gene IL-1 β do doente ou o haplotipo do gene IL-1 β do doente passam pela detecção de SNPs no cromossoma que estejam em desequilíbrio de ligação ("linkage disequilibrium") com o polimorfismo -511 ou com o polimorfismo -31 no gene IL-1 β e utilização da relação com o referido SNP ou SNPs para determinar a natureza do par de nucleótidos ou haplotipo com interesse e utilização desta informação para estimar o aumento de colesterol durante a terapia IM e para tomar decisões de tratamento.

É ainda descrito um estojo ("kit") para determinação da natureza do haplotipo do gene IL-1 β , o qual inclui: um contentor com pelo menos um reagente específico para a detecção da natureza do par de nucleótidos no local polimórfico -511 do gene IL-1 β ; e um contentor com pelo menos um reagente específico para detecção da natureza do par de nucleótidos no local polimórfico -31 do gene IL-1 β ; e instruções para determinação do haplotipo a partir dos resultados referidos e instruções para opções de tratamento recomendadas baseadas na natureza do haplotipo indicado.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1: Média LS dos níveis de colesterol total comparados para os genótipos (-511) IL-1 β CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B251.

Figura 2: Média LS dos níveis de colesterol total comparados para os genótipos (-31) IL-1 β CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B251.

Figura 3: Média LS dos níveis de colesterol HDL comparados para os genótipos (-511) IL-1 β CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B251.

Figura 4: Média LS dos níveis de colesterol HDL comparados para os genótipos (-31) IL-1 β CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B251.

Figura 5: Média LS dos níveis de colesterol LDL comparados para os genótipos (-511) IL-1 β CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B251.

Figura 6: Média LS dos níveis de colesterol LDL comparados para os genótipos (-31) IL-1 β CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B251.

Descrição detalhada do invento

O presente invento proporciona métodos para determinar o grau do aumento de colesterol sérico que ocorrerá num doente durante o tratamento com uma medicação imunossupressora (IM), como seja rapamicina ou seus derivados.

Numa realização, um doente que seja um potencial candidato ao tratamento com um IM será sujeito a uma colheita de sangue para a determinação da presença de um polimorfismo, *i.e.*, citosina (C)→timina (T) na posição nucleotídica -511 (na região do promotor, sem alteração de aminoácido); esta é uma alteração C→T na posição

nucleotídica 1423 da sequência X04500, nas duas cópias do gene da interleucina-1-beta (IL-1 β) presente no doente. Se o par de nucleótidos na posição -511 for AT em ambas as cópias do gene, então o doente sofrerá um aumento elevado nos níveis de colesterol sérico durante o tratamento com um IM.

Se o par de nucleótidos na posição -511 for AT numa cópia e CG na outra cópia, então o doente terá um aumento intermédio nos seus níveis de colesterol durante o tratamento com uma medicação imunossupressora.

Se o par de nucleótidos for GC em ambas as cópias na posição -511, então o doente terá um aumento baixo nos níveis séricos de colesterol durante o tratamento com um IM.

Numa outra realização, a determinação de quais as medicações a usar para tratar um doente necessitado de tratamento com um IM será baseada nos resultados da determinação da natureza dos pares de nucleótidos na posição -511 no gene IL-1 β presente no doente.

Se ambos os pares de nucleótidos forem GC então o doente será tratado com um IM. Esta medicação imunossupressora poderá ser qualquer uma das apresentadas na Tabela 2, incluindo rapamicina ou um dos seus derivados, incluindo mas não estando limitado a everolimus (CerticanTM) (RAD).

Se ambos os pares de nucleótidos forem AT, ou se um par for AT e o outro for GC, então o doente será tratado com uma medicação alternativa que não induzirá níveis elevados de colesterol ou, como alternativa, o doente será tratado com um fármaco que baixe o colesterol para além de IM e os níveis de colesterol do doente serão monitorizados durante o tratamento. Este fármaco para baixar o colesterol, que poderá ser usado em combinação com IM, poderá ser um ou mais medicamentos escolhidos da lista apresentada na Tabela 1 abaixo.

Numa outra realização, um doente que seja um potencial candidato ao tratamento com um IM será sujeito a uma colheita de sangue para a determinação da presença de um polimorfismo T→C na posição nucleotídica -31 (na região do promotor, sem alteração de aminoácido); esta é uma alteração T→C na posição nucleotídica 1903 da sequência X045000 nas duas cópias do gene IL-1 β presente no doente. Se o par de nucleótidos na posição -31 for um CG em ambas as cópias do gene, então o doente sofrerá um aumento elevado dos níveis de colesterol sérico durante o tratamento com um IM. Se o par de nucleótidos na posição -31 for AT numa cópia e CG na outra cópia, então o doente terá um aumento intermédio nos seus níveis de colesterol durante o tratamento com um IM. Se o par de nucleótidos for AT em ambas as cópias na posição -31, então o doente terá um aumento baixo do colesterol sérico durante o tratamento com um IM.

Numa outra realização, a determinação das medicações a serem usadas para tratar um doente necessitado de tratamento com um IM será baseada nos resultados da determinação da natureza dos pares de nucleótidos na posição -31 no gene IL-1 β presente no doente. Se ambos os pares de nucleótidos forem AT então o doente será tratado com um IM.

Este IM poderá ser qualquer um dos apresentados na Tabela 2 incluindo, mas não estando limitado a rapamicina ou um dos seus derivados incluindo, mas não estando limitado a everolimus (CERTICAN™) (RAD).

Se ambos os pares de nucleótidos forem GC ou se o par de nucleótidos for AT numa cópia e CG na outra cópia, então o doente será tratado com uma medicação alternativa que não aumente os níveis de colesterol ou, em alternativa, o doente será tratado com um fármaco que baixe o colesterol para além do IM e os níveis de colesterol do doente serão monitorizados durante o tratamento. Este fármaco para baixar o colesterol, que será usado em combinação com IM, será um ou mais medicamentos escolhidos da lista apresentada na Tabela 1 abaixo.

As rapamicinas adequadas para usar nos métodos deste invento são, e.g., como descrito nas Patentes U.S. Nos 3 929 992 e 5 258 389 e em WO 94/09010 e WO 01/60345.

Tabela 1. Agentes antilipêmicos (fármacos para baixar o colesterol)

Sequestradores dos ácidos biliares

Colestipol (COLESTID™ *Pharmacia & Upjohn*)

Derivados de ácido fíbrico

Clofibrato (ATROMID-S™ *Wyeth-Ayerst*)Gemfibrozil (LOPID™ *Park-Davis*)Fenofibrato (TRICOR™ *Abbott*)

Inibidores da redutase de HMG-CoA

Fluvastatina (LESCOL™ *Novartis*)Atorvastatina (LIPITOR™ *Parke-Davis*)Lovastatina (MEVACOR™ *Merck*)Pravastatina (PRAVACOL™ *Bristol-Myers Squibb*)Simvastatina (ZOCOR™ *Merck*)

Ácido nicotínico

Niacina (NIASPAN™ *Kos*)

Tabela 2 Fármacos imunossupressores

Rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE™)

Everolimus (CERTICAN™) (RAD)

Ácido micofenólico e Micofenolato Mofetil (CELLCEPT™) (MMF)

Azatioprina (IMURAN™)

Ciclosporina (NEORAL™)

Tacrolimus (PROGRAF™)

O exemplo que se segue é proporcionado apenas com fim ilustrativo e não se destina a limitar o invento descrito.

EXEMPLO 1

O estudo RAD B251

Desenho global do estudo

O estudo RAD B251 foi um estudo multicêntrico, randomizado, com dupla ocultação, com grupos paralelos para avaliar a eficácia e segurança de everolimus (Certican™) (RAD) versus micofenolato mefetil (MMF) usado em combinação com ciclosporina (CsA) (NEORAL®) e prednisona. O estudo consistiu em três períodos: um período de rastreo, um período de linha de base e um período de tratamento com dupla ocultação. Após as avaliações da linha de base, os doentes que preenchiam os critérios de inclusão/exclusão foram distribuídos ao acaso pelos três grupos de tratamento (1:1:1) uma vez avaliado que o transplante é funcional e que a medicação oral pode ser tolerada (dentro de 48 horas pós-transplante). A determinação da função do transplante foi realizada através da avaliação de investigadores e baseou-se na quantidade adequada de urina excretada e nos dados de abaixamento dos níveis de creatinina. O dia da distribuição pelos grupos e da administração da primeira dose da medicação em estudo foi registado como o Dia 1 do estudo. Os três grupos de tratamento estão descritos abaixo:

- Nível de dosagem 1: 0,75 mg RAD bid + NEORAL® + prednisona
- Nível de dosagem 2: 1,5 mg RAD bid + NEORAL® + prednisona
- Elemento de comparação: 1 g MMF bid + NEORAL® + prednisona

Terapia concomitante

Iniciação e manutenção de NEORAL®

A administração de CsA (NEORAL®) foi iniciada a 6-12 mg/Kg/dia p.o. e foi ajustada para manter o mesmo nível durante 12 horas reflectindo uma gama alvo padrão do ensaio. A administração intravenosa (i.v.) de CsA foi evitada a menos que indicado pela situação clínica. Os níveis sanguíneos globais foram ajustados às gamas terapêuticas apresentadas abaixo tão rapidamente quanto possível. Uma vez isto conseguido, as doses de CsA foram apenas ajustadas para manutenção dos níveis sanguíneos dentro das gamas alvo.

- Semanas 1-4: 200-350 ng/ml
- Semanas 2-36: 100-300 ng/ml

Nos dias da colheita de sangue para medições de CsA ou RAD, o doente recebeu a última dose de NEORAL® e a medicação em estudo 12 ± 1 horas antes da colheita. Os doentes foram instruídos para ajustar o seu horário de

medicação no dia anterior ao da colheita de sangue para se conseguir um intervalo adequado e o tempo exacto de administração da dose da noite foi registado. A medicação em estudo e NEORAL® correspondentes ao dia da colheita não foram tomados pelo doente, mas antes levados para a clínica e tomados após completada a colheita de sangue.

Prednisona

Imediatamente antes do transplante, os doentes puderam receber até 1 g de metilprednisolona i.v. e depois até 500 mg de metilprednisolona i.v. 12 horas mais tarde. Logo que possível após transplante, a prednisona oral foi iniciada a 0,35-2,0 mg/Kg/dia e ajustada de forma a atingir uma dose de 20 mg/dia ou 0,25 mg/Kg/dia no Dia 30 e nunca inferior a 5 mg/dia durante os primeiros seis meses.

Profilaxia de citomegalovírus (CMV)

A profilaxia de CMV foi obrigatória para todos os casos em que o dador era positivo e o recipiente negativo para CMV. O tratamento com ganciclovir, globulina hiperimmune contra CMV ou aciclovir foi permitido e foi administrado de acordo com a prática local. Todos os casos para além dos dadores positivos para CMV e recipientes negativos para CMV foram tratados de acordo com a prática local. A profilaxia de CMV foi igualmente recomendada após qualquer tratamento com anticorpos dos episódios de rejeição aguda.

Profilaxia de PCP

Todos os doentes foram também iniciados em trimetropim-sulfametoxazole, um único comprimido por dia, começando quando a medicação oral pode ser tolerada e continuando ao longo dos primeiros seis meses após transplante. A dosagem foi baixada de acordo com o critério do investigador até um único comprimido 3 vezes por semana durante os segundos seis meses. Após um ano, o tratamento foi de acordo com a prática local. A pentamidina ou a dapsona em aerossol foi administrada aos doentes incapazes de tolerar trimetropim-sulfametoxazole.

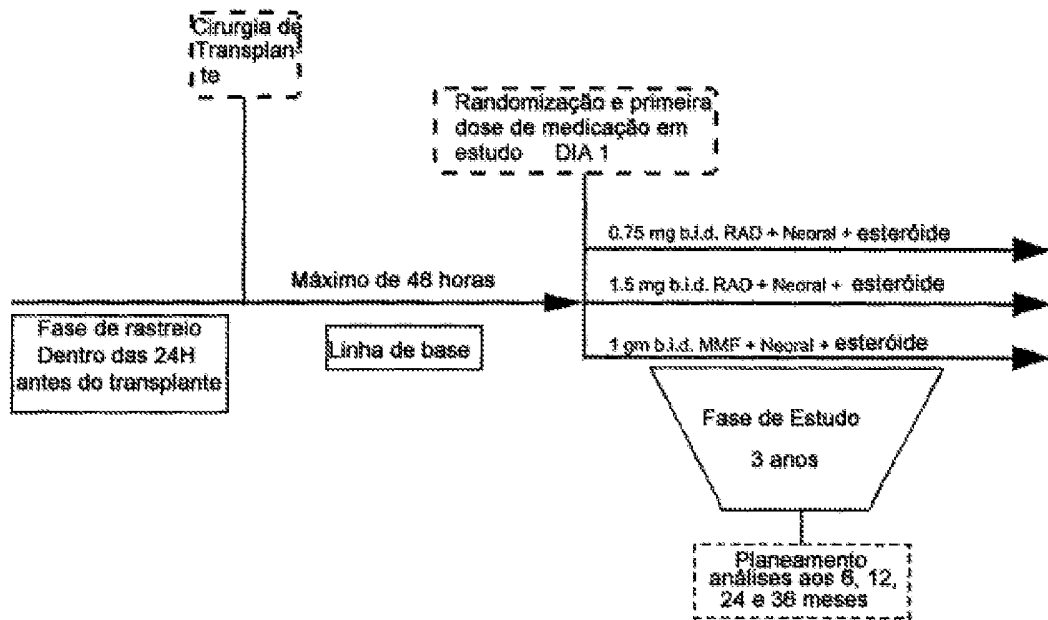
Outra terapia concomitante

Durante todo o período de tratamento do estudo, não foi administrada outra medicação que não os fármacos do estudo, a profilaxia do estudo e as medicações usuais dos doentes, *i.e.*, desde o primeiro dia do rastreio até estarem completas todas as avaliações finais do estudo. As exceções a esta regra aplicaram-se apenas às medicações necessárias para tratar efeitos adversos (AEs). A administração de qualquer medicação adicional (incluindo medicamentos de venda livre e vitaminas) foi claramente documentada no Formulário do Relatório do Caso Clínico (CRF) das medicações anteriores e concomitantes. Se necessário para um AE, medicações concomitantes foram claramente documentadas e referenciadas nos AEs do CRF.

Todos os fármacos imunossupressores, para além dos especificados pelo protocolo foram proibidos. A terapia anti-rejeição permissível inclui metilprednisona e a terapia com anticorpos anti-linfócitos de acordo com as orientações no "Treatment of Acute Rejection Episodes". Os doentes que requerem tacrolimus ou MMF como terapia de resgate foram descontinuados do fármaco em estudo. Terfenadina, astemizole e cisaprida foram proibidos enquanto o doente esteve na medicação em estudo. A utilização de fenobarbital, fenitoína, carbamazepina ou cetoconazole foi fortemente desencorajada.

Após transplante seguiu-se um período de tratamento de três anos. Durante o período de tratamento com dupla ocultação, os doentes foram observados nos Dias 7, 14 e 28 e nos Meses 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 e 36. As biopsias renais foram necessárias na linha de base (pode ser intra-operativa) e na altura de qualquer suspeita de rejeição. A administração cega do fármaco em estudo cessou ao fim de 3 anos.

Os doentes masculinos e femininos, 16-65 anos de idade, que foram seleccionados para receber o transplante de rim cadavérico primário, vivo de dador não relacionado ou de dador relacionado sem HLA idêntico, puderam entrar no estudo. Os doentes que descontinuaram o estudo prematuramente não foram substituídos. Cada um dos doentes tinha de preencher todos os critérios de inclusão/exclusão para serem elegíveis para a entrada no estudo.

Esquema do estudo

O estudo RAD B251 foi desenhado para avaliar a segurança e eficácia de duas doses orais de RAD comparativamente com MMF, nos recipientes de transplante renal de novo, conforme medido pela incidência dos episódios de rejeição aguda do transplante demonstrado por biopsia, perda do transplante ou morte. MMF foi escolhido como agente de comparação devido ao seu largo uso no transplante renal.

Análise farmacogenética

Num esforço para identificar factores genéticos que estão associados ao aumento dos níveis de colesterol e de lípidos observado em doentes tratados com everolimus (RAD), foram estudados 47 polimorfismos de nucleótidos individuais ("single nucleotide polymorphisms", SNPs) de 24 genes do DNA genómico dos doentes que participaram nos

ensaios clínicos RAD B251. Dos 47 SNPs que foram examinados, determinou-se experimentalmente que 21 não são polimórficos. Dos 26 que eram polimórficos, dois SNPs no promotor do gene de IL-1 β nas posições (-511) e (-31) apresentaram significância estatística relativamente a alterações nos níveis de colesterol em doentes que participaram no ensaio clínico RAD B251.

Os doentes que eram homozigóticos para a transição de bases C \rightarrow T (T-T) de IL-1 β (-511) ou para a transição de bases T \rightarrow C (C-C) de IL-1 β (-31) tinham os níveis médios mais altos de colesterol total na sua última visita, independentemente do tratamento recebido durante o estudo ($p = 0,0018$ e $p = 0,0013$ respectivamente). (Os valores nas figuras, etc. referem-se aos níveis absolutos de colesterol sérico na linha de base na última visita, no entanto durante a análise estatística este valor foi definido como a variável dependente e o nível de colesterol na linha de base como a variável independente tendo automaticamente em consideração o nível da linha de base)

O aumento nos níveis de colesterol total foi devido aos níveis crescentes de HDL e de LDL: os doentes homozigóticos para o alelo T na posição (-511) ou para o alelo C na posição (-31) tinham os níveis mais elevados de médias de mínimos quadrados para HDL ($p = 0,0214$ e $p = 0,0514$, respectivamente) e LDL ($p = 0,0159$ e $p = 0,0091$, respectivamente) na sua última visita. No entanto, é importante que as razões de HDL/LDL permaneceram as mesmas independentemente do genótipo.

Assim, os nossos resultados sugerem que os indivíduos homozigóticos para o alelo T na posição (-511) e homozigóticos para o alelo C na posição (-31) do promotor do gene IL-1 β podem estar predispostos a maiores aumentos nos níveis de colesterol total do sangue quando do tratamento com o regime RAD/NEORAL® ou MMF/NEORAL®.

Métodos

Amostras

Um total de 82 amostras individuais do ensaio clínico RAD B251 foram genotipadas quando do consentimento para participar na avaliação farmacogenética. Isto representa cerca de 15% da população total que participou no ensaio clínico RAD B251. Amostras de sangue de cada doente foram colhidas nos locais de ensaio dos indivíduos e depois enviadas para Covance (Geneva, Suíça). O DNA genómico de cada doente foi extraído do sangue por Covance usando o estojo ("kit") de isolamento de DNA "GENE™ DNA Isolation estojo ("kit")" (D-50K) (Gentra, Minneapolis, MN).

Genotipagem

Um total de 47 polimorfismos individuais, correspondendo a 24 genes, foi analisado para cada ensaio clínico. Os genes candidatos envolvidos no metabolismo do fármaco, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, imunossupressão e

inflamação foram os escolhidos para este estudo. Os ensaios de SNPs foram desenhados usando informação das bases de dados públicas, tais como OMIM, o SNP Consortium, Locus Link e dbSNP e a morada de Internet da Third Wave Technologies, Inc. (TWT, Madison, WI) (<http://64.73.25.65:8080/coe/index.jsp>). As séries de sondas resultantes para o ensaio de genotipagem foram geradas por TWT. A genotipagem foi realizada com 60 ng de DNA genómico usando o ensaio INVADER® desenvolvido por TWT (9-10) de acordo com as instruções do fabricante. Ver Lyamichev *et al.*, Nat. Biotechnol., Vol. 17, pp 292-296 (1999); e Ryan, Mol. Diagn., Vol. 4, pp. 135-144 (1999).

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) para o SNP (-511) de IL-1 β foi realizada num volume de 20 μ l de reacção contendo: 10-70 ng de DNA genómico, dNTPs 160 μ M, Tris-HCl 10 mM [pH 8,3], KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, sequência iniciadora directa IL-1 β (-511) 0,6 μ M, sequência iniciadora reversa IL-1 β (-511) 0,6 μ M e 0,03 U de DNA polimerase Taq (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram feitos trinta e seis (36) ciclos de amplificação usando as seguintes condições: 94°C, 30 segundos; 55°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos. Nove amostras foram então fraccionadas (5 μ l) num gel de 2% de agarose e visualizadas por coloração com brometo de etídio para confirmar a amplificação. Uma diluição de 1:7 do produto de PCR foi corrida paralelamente com TWT SNP#128069 usando uma placa biplex de 384 alvéolos para o DNA amplificado.

As sequências das sequências iniciadoras foram as seguintes:

IL-1 β (-511)-directo 5'-GCAGAGCTCATCTGGCATTG-3' (SEQ ID NO:1)

IL-1 β (-511)-reverso 5'-TATGTGGGACAAAG TGGAAG-3' (SEQ ID NO:2).

O PCR para o SNP (-31) de IL-1 β foi realizado num volume de 25 μ l de reacção contendo: 1 ng de DNA genómico, dNTPs 40 μ M, Tris-HCl 10 mM [pH 8,3], KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, sequência iniciadora directa IL-1 β (-311) 0,75 μ M, sequência iniciadora reversa IL-1 β (-31) 0,75 μ M e 0,15 U de DNA polimerase Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram feitos trinta e oito (38) ciclos de amplificação usando as seguintes condições: 94°C, 30 segundos; 58°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos. Todas as amostras foram então fraccionadas (5 μ l) num gel de 2% de agarose e visualizadas por coloração com brometo de etídio para confirmar a amplificação.

As sequências das sequências iniciadoras foram as seguintes:

IL-1 β (-31)-directo 5'-GCACAACGATTGTCAGGAAAAC-3' (SEQ ID NO:3)

IL-1 β (-31)-reverso 5'-ATGCATACA CACAAAGAGGCAG-3' (SEQ ID NO:4).

Uma diluição de 1:10 do produto de PCR foi corrida paralelamente com TWT SNP#274339 para RAD B251, usando uma placa biplex de 384 alvéolos para o DNA amplificado. A análise por RFLP foi usada para determinar genótipos usando a enzima de restrição Alu-I (New England

Biolabs, Beverly, MA). As digestões de RFLP foram realizadas em 20 µl de reacção contendo: NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM [pH 7,9], 8 ng de DNA genómico amplificado e enzima Alu-I 0,5 mM. Todas as amostras foram incubadas durante 17 horas a 37°C e depois fraccionadas (19 µl) num gel de 3% de agarose e visualizadas por coloração com brometo de etídio para determinar o tamanho da banda.

Sequência nucleotídica que rodeia o polimorfismo (-511) de IL-1β

Gene	Posição	Alelo 1	Alelo 2	Sequência envolvente
IL-1β	-511	C	T	CTGCAATTGACAGAGAGCTCC [C,T] GAGGCAGAG AACAGCACCCAAGGTAGAGACCCA

Alelo 1 (SEQ ID NO:5);

CTGCAATTGACAGAGAGCTCC [C] GAGGCAGAGAACAGCACCCAAGGTAGAGACCCA

Alelo 2 (SEQ ID NO:6);

CTGCAATTGACAGAGAGCTCC [T] GAGGCAGAGAACAGCACCCAAGGTAGAGACCCA

Sequência nucleotídica que rodeia o polimorfismo (-31) de IL-1β

Gene	Posição	Alelo 1	Alelo 2	Sequência envolvente
IL-1β	-31	C	T	TCCTACTTCTGCTTTTGAAAGC [T,C] ATAAAAAC AGCGAGGGAGAACTGGCAGATACCAAACCTC

Alelo 1 (SEQ ID NO:7)

TCCTACTTCTGCTTTTGAAAGC[C]ATAAAAAACAGCGAGGGAGAACTGGCAGATACCA AACCTC

Alelo 2 (SEQ ID NO:8)

TCCTACTTCTGCTTTTGAAAGC[T]ATAAAAAACAGCGAGGGAGAACTGGCAGATACCAA ACCTC

Análise estatística

Uma análise de modelo de covariância foi usada para a análise do efeito de genótipo e tratamento nos níveis de colesterol usando a série de dados clínicos de 24 meses lab_b.sd2 RABD 251. Os termos no modelo incluem o nível de colesterol final, o nível de colesterol inicial como covariante e o genótipo e o tratamento como principais efectores. Os "Odds Ratio", intervalo de confiança de 95%, e a análise de Chi-quadrado foram calculados quando aplicável. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa informático SAS 8.02. Para corrigir para múltiplos testes, foi efectuado o método de correcção de Bonferroni.

Resultados

No estudo RAD B251, 47 SNPs individuais, correspondendo a 24 genes, foram genotipados para cada doente que anuíram à análise farmacogenética e que participaram no ensaio clínico RAD B251. Uma comparação dos doentes que anuíram na análise farmacogenética relativamente à distribuição global dos doentes para cada ensaio clínico está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. RAD B251: Distribuição das amostras farmacogenéticas comparativamente com as amostras da globalidade dos ensaios clínicos

	Amostras farmacogenéticas	Amostras do ensaio
Idade (anos)	43,34	43,49
Raça		
Caucasiana	(61) 74%	(388) 68%
Negra	(9) 11%	(93) 16%
Oriental	(0) 0%	(11) 2%
Outra	(12) 15%	(76) 13%
Género		
Masculino	(51) 62%	(357) 63%
Feminino	(31) 38%	(211) 37%
Tratamento		
RAD001 (1,5 mg/d)	(24) 29,3%	(189) 33,3%
RAD001 (3,0 mg/d)	(29) 35,3%	(189) 33,3%
MMF (2 g/d)	(29) 35%	(190) 33,4%
Peso (Kg)	80,7	77,1
Linha de base		
CHO (mg/dL)	168,7	162,8
HDL (mg/dL)	40,9	40,8
LDL (mg/dL)	96,6	96,8
TGC (mg/dL)	155,3	119,9
Fim do tratamento		
CHO (mg/dL)	234,5	232,2
HDL (mg/dL)	52,7	53,3
LDL (mg/dL)	123,2	126,6
TGC (mg/dL)	283,0	254,6

Apenas uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a população de doentes usada no estudo farmacogenético comparativamente com a população de doentes em geral no ensaio clínico RAD B251: encontrou-se

que as diferenças nos valores médios de TGC entre a população de doentes do estudo farmacogenético e a população de doentes em geral de RAD B251 são estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Esta comparação sugere assim que a população de doentes usada no estudo farmacogenético é representativa da população de doentes em geral testada em cada ensaio. Dos 47 SNPs que foram testados neste estudo, determinou-se experimentalmente que 21 não são polimórficos. Assim, foram usados 26 SNPs na análise descrita abaixo.

A análise estatística dos genótipos com a série de dados clínicos de RAD B251 identificou um polimorfismo dentro do promotor do gene IL-1 β na posição (-511) que tinham uma associação estatisticamente significativa com os níveis de colesterol. Como se mostra na Tabela 4 e Figura 1, o genótipo (-511) (T-T) de IL-1 β em doentes de ambos os grupos de tratamento em conjunto está correlacionado com os maiores aumentos nos níveis de colesterol medidos na sua última visita ($p = 0,018$).

Tabela 4. Média LS dos níveis de colesterol total (mg/dl) de acordo com os genótipos (-511) CC, CT ou TT de IL-1 β e grupos de tratamento dentro do ensaio clínico RAD B251

	RAD			MMF			Grupos de tratamento		
	(1,5 e 3,0 mg/dia)			(2 mg/dia)			RAD e MMF combinados		
Genótipo	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Nº de doentes	20	25	9	12	9	7	32	34	16
Média LS	217,3	242,9	290,3	200,9	229,6	254,1	211,4	239,5	272,9
Valor de p	0,0125	0,0125	0,0125	0,0866	0,866	0,0866	0,0018	0,0018	0,0018

Uma associação semelhante foi observada para o genótipo 8-31) (C-C) de IL-1 β ($p = 0,0013$) (Tabela 5 e Figura 2).

Tabela 5. Média LS dos níveis de colesterol total (mg/dl) de acordo com os genótipos (-31) CC, CT ou TT de IL-1 β e com os grupos de tratamento dentro do ensaio clínico RAD B251

	RAD			MMF			Grupos de tratamento		
	(1,5 e 3,0 mg/dia)			(2 mg/dia)			RAD e MMF combinados		
Genótipo	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Nº de doentes	9	26	19	7	9	12	16	35	31
Média LS	291,1	240,4	216,6	254,1	239,6	200,9	272,9	239,5	211,4
Valor de p	0,009	0,009	0,009	0,0625	0,0625	0,0625	0,0013	0,0013	0,0013

Para analisar mais detalhadamente esta correlação, testou-se se existia uma associação entre o genótipo (-511) de IL-1 β e os níveis de HDL e LDL. Como se mostra na Figura 3 e na Tabela 6, o genótipo (-511) (T-T) de IL-1 β em doentes de ambos os grupos de tratamento em conjunto está correlacionado com os níveis mais elevados de HDL medidos na sua última visita ($p = 0,0214$).

Tabela 6. Média LS dos níveis de HDL (mg/dl) de acordo com os genótipos (-511) CC, CT ou TT de IL-1 β e com os grupos de tratamento dentro do ensaio clínico RAD B251

	RAD			MMF			Grupos de tratamento		
	(1,5 e 3,0 mg/dia)			(2 mg/dia)			RAD e MMF combinados		
Genótipo	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Nº de doentes	20	25	9	12	9	7	32	34	16
Média LS	47,6	54,9	68,4	45,5	56,8	50,4	47,8	54,4	58,9
Valor de p	0,0164	0,0164	0,0164	0,0819	0,0819	0,0819	0,0214	0,0214	0,0214

Foi anteriormente descrito que o polimorfismo (-511) de IL-1 β está em forte desequilíbrio de ligação com um outro polimorfismo na posição (-31) do promotor de IL-1 β . Ver El-Omar *et al.*, Nature, Vol. 404, pp. 398-402 (2000). Neste estudo, foram testados 254 alelos em doentes que concordaram com a análise farmacogenética no ensaio clínico RAD B251. É descrito que os polimorfismos (-511) e (-31) de IL-1 β apresentam 99,2% de desequilíbrio de ligação. Assim, uma associação semelhante a ocorrer entre o polimorfismo (-511) de IL-1 β e os níveis de colesterol poderá ser igualmente detectada para o polimorfismo (-31) de IL-1 β . A análise estatística da série de dados clínicos de RAD B251 para o polimorfismo (-31) de IL-1 β identificou uma associação significativa com os níveis de colesterol. Como se mostra na Tabela 5 e Figura 2, o genótipo (-31) (C-C) de IL-1 β em doentes de ambos os grupos de tratamento em conjunto está correlacionado com os aumentos mais elevados de colesterol total medido na sua última visita ($p = 0,0013$). Para analisar melhor esta correlação, testámos se existia uma associação entre o genótipo (-31) de IL-1 β e os níveis de HDL e LDL. Como se mostra na Figura 4 e Tabela 7, o genótipo (-31) (C-C) de IL-1 β em doentes de ambos os grupos de tratamento em conjunto estão fracamente correlacionados com os níveis mais elevados de HDL medidos na sua última visita ($p = 0,0514$).

Tabela 7. Média LS dos níveis de HDL (mg/dl) de acordo com os genótipos (-31) CC, CT ou TT de IL-1 β e com os grupos de tratamento dentro do ensaio clínico RAD B251

	RAD (1,5 e 3,0 mg/dia)			MMF (2 mg/dia)			Grupos de tratamento RAD e MMF combinados		
Genótipo	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Nº de doentes	9	26	19	7	9	12	16	35	31
Média LS	65,1	55	48,4	50,4	56,8	45,5	58,9	54,4	47,8
Valor de p	0,0205	0,0205	0,0205	0,1893	0,1893	0,1893	0,0514	0,0514	0,0514

Uma correlação semelhante foi igualmente identificada com os níveis de LDL ($p = 0,0159$, Figura 5 e Tabela 8).

Tabela 8. Média LS dos níveis de LDL (mg/dl) de acordo com os genótipos (-511) CC, CT ou TT de IL-1 β e com os grupos de tratamento dentro do ensaio clínico RAD B251

	RAD (1,5 e 3,0 mg/dia)			MMF (2 mg/dia)			Grupos de tratamento RAD e MMF combinados		
Genótipo	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Nº de doentes	20	25	9	12	9	7	32	34	16
Média LS	112,5	123,6	144,5	113,9	118,6	143,7	110,5	123,8	145,8
Valor de p	0,1646	0,1646	0,1646	0,2848	0,2848	0,2848	0,0159	0,0159	0,0159

Uma correlação mais forte foi identificada com os níveis de LDL e o polimorfismo (-31) de IL-1 β ($p = 0,0091$, Figura 6 e Tabela 9).

Tabela 9. Média LS dos níveis de LDL (mg/dl) de acordo com os genótipos (-31) CC, CT ou TT de IL-1 β e com os grupos de tratamento dentro do ensaio clínico RAD B251

	RAD			MMF			Grupos de tratamento		
	(1,5 e 3,0 mg/dia)			(2 mg/dia)			RAD e MMF combinados		
Genótipo	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Nº de doentes	9	26	19	7	9	12	16	35	31
Média LS	145,1	124,1	112,2	143,1	119,8	107,7	145,9	124,5	108,5
Valor de p	0,143	0,143	0,143	0,2061	0,2061	0,2061	0,0091	0,0091	0,0091

É de salientar que as taxas de HDL e LDL permaneceram inalteradas entre os grupos de genótipos. Os resultados apresentados neste estudo prevêem uma maior probabilidade de os indivíduos com um determinado alelo sofrerem aumentos persistentes nos níveis de colesterol, quando do tratamento com o regime RAD/NEORAL®, relativamente aos indivíduos que não possuem o alelo. Uma tendência semelhante foi identificada em indivíduos tratados com o regime MMF/NEORAL®, mas os resultados não atingem a significância estatística de $p = 0,05$.

Uma vez que níveis de colesterol do sangue ≥ 240 mg/dl são, de um modo geral, considerados como excessivamente elevados, foi assim decidido determinar a "Odds Ratio" para um doente com os polimorfismos (-511) ou (-31) de IL-1 β vir a ter um aumento nos níveis de colesterol total no sangue resultando numa concentração final ≥ 240 mg/dl após ser tratado com os regimes RAD/NEORAL® ou MMF/NEORAL®. Ver, Cecil Textbook of Medicine, Goldman e Bennett, editores, Saunders, 6ª Edição (2000).

Como se mostra na Tabela 10 abaixo, a "Odds Ratio" indica que os doentes têm 5,67 (95% de intervalo de confiança: 1,20-9,01) vezes mais probabilidade de ter um aumento nos níveis de colesterol total no sangue para uma concentração final ≥ 240 mg/dl, após serem tratados com o regime RAD/NEORAL®, se possuírem um T na posição (-511) no promotor do gene IL-1 β ou 7,23 (95% de intervalo de confiança: 1,20-9,01) vezes mais provável terem um aumento dos níveis de colesterol total para uma concentração final ≥ 240 mg/dl, após serem tratados com o regime RAD/NEORAL®, se possuírem um C na posição (-31) do promotor do gene IL-1 β . Estes resultados são estatisticamente significativos ($p = 0,0207$ e $p = 0,0096$, respectivamente) e poderão ser usados como medida preventiva nos doentes transplantados com o regime RAD/NEORAL®, uma vez que a hipercolesterolemia é facilmente tratável.

Tabela 10. "Odds Ratio" para os genótipos (-511) e (-31) de IL-1 β e níveis de colesterol

Polimorfismo (-511) de IL-1 β				Polimorfismo (-31) de IL-1 β			
Obs.	Genótipo		Total	Obs.	Genótipo		Total
Exp.	CT-TT	CC		Exp.	CC-CT	TT	
>239 mg/dl	24	7	31	>239 mg/dl	25	6	31
	18,9	12,10	51		19,28	11,72	51
≤ 239 mg/dl	26	25	82	≤ 239 mg/dl	26	25	82
	31,10	19,90			31,72	19,28	
	50	32			51	31	
"Odds Ratio" = 5,67 (95% CI: 1,20-9,01) $p = 0,0207$ (teste exacto de Fisher)				"Odds Ratio" = 7,23 (95% CI: 1,20-9,01) $p = 0,0096$ (teste exacto de Fisher)			

Correcção de Bonferroni para testes múltiplos

É necessário um factor de correcção devido ao número de SNPs que foram analisadas neste estudo. Para o fazer, foi aplicado o método de correcção de Bonferroni que deu origem a um valor de p de 0,0019.

$$\text{Bonferroni} = \frac{0,05}{\eta} = \frac{0,05}{26} = 0,0019$$

η = número de testes RAD

Desta forma, a associação entre os polimorfismos (-511) e (-31) de IL-1 β e os níveis de colesterol total (p = 0,0018 e p = 0,0013, respectivamente) é ainda considerado como significativo.

Desequilíbrio de ligação das SNPs (-511) e (-31) de IL-1 β

Foi descrito que o polimorfismo (-511) C→T de IL-1 β está em forte desequilíbrio de ligação (99,5%) com um outro polimorfismo dentro do promotor de IL-1 β situado na posição (-31) que resulta numa transição de bases T→C. Ver El-Omar *et al.*, Nature, Vol. 398-402 (2000). Assim, prevê-se que os doentes com um T na posição (-511) do promotor de IL-1 β terão um C na posição (-31). Este resultado é confirmado nos doentes testados nestes dois ensaios. No gene IL-1 β selvagem, T é encontrado na posição -31. Este T

é muito importante para a expressão de IL-1 β devido a ser parte da sequência da caixa TATA (TATAAAA), a qual desempenha um papel crítico na iniciação da transcrição de IL-1 β . Em geral, as sequências da caixa TATA estão envolvidas no recrutamento e posicionamento da maquinaria de transcrição na posição correcta dentro dos genes para assegurar que a transcrição começa no local correcto. O polimorfismo T \rightarrow C na posição (-31) destruirá esta importante sequência de caixa TATA (TATAAAA para CATAAAA), tornando-a inactiva e proibindo a iniciação eficiente da transcrição do gene IL-1 β . Foi demonstrada a ausência da ligação da maquinaria de transcrição a esta sequência de caixa TATA alterada de IL-1 β . Ver El-Omar, *supra*.

Assim, a existência de qualquer outro polimorfismo que esteja em desequilíbrio de ligação com qualquer um dos polimorfismos dentro do promotor de IL-1 β (situado na posição (-31) que resulte numa transição de bases T \rightarrow C) ou o polimorfismo situado em -511 (C \rightarrow T) do promotor de IL-1 β , também terá um efeito preditivo no grau de aumento do colesterol esperado num doente durante o tratamento com um IM. Os meios para a determinação de outros polimorfismos que estejam em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo (-31) são bem conhecidos dos familiarizados com a matéria. Qualquer um destes polimorfismos, agora conhecido ou descoberto no futuro, poderá ser usado nos métodos deste invento para prever o grau de probabilidade de aumento de colesterol nos doentes tratados com um IM ou para ajudar a determinar as escolhas de tratamento para tais doentes.

Significado biológico dos resultados

O genótipo (-31) (C-C) de IL-1 β possui relevância clínica. Demonstrou-se que IL-1 β inibe a biossíntese de colesterol em 35%. Ver El-Omar *et al.*, *supra*. Assim, o resultado deste polimorfismo significará que os doentes com o genótipo (-31) (C-C) de IL-1 β , correspondendo ao genótipo (-511) (T-T) de IL-1 β , terão níveis mais baixos de IL-1 β , perdendo portanto a inibição da biossíntese de colesterol por IL-1 β , resultando em níveis elevados de colesterol no sangue. Este tipo de resultado foi observado no ensaio RAD B251. Como se mostra nas Tabelas 4 e 5 e Figuras 1-2, os doentes com o genótipo (-511) (T-T) de IL-1 β e com o genótipo (-31) (C-C) de IL-1 β tinham os níveis médios mais elevados de colesterol total, independentemente do tratamento.

Foi igualmente descrito que IL-1 β aumenta a expressão do gene do receptor de LDL através da activação das cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs). Ver Kumar *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 273, pp. 15742-15748 (1998).

Os aumentos na expressão do receptor de LDL resultarão num aumento da quantidade de colesterol que é internalizado pelas células, baixando assim os níveis de colesterol total do sangue. Este facto tem importância para RAD (everolimus), uma vez que se demonstrou que este fármaco inibe as vias bioquímicas que são necessárias para

a progressão da célula para G1 tardia e entrada em S. É de salientar que se demonstrou que as ERKs estão envolvidas neste processo. Assim, é possível que a actividade ERK seria baixada por everolimus. Devido ao everolimus inibir a a actividade ERK, a expressão do receptor de LDL baixaria em todos os doentes, independentemente da expressão de IL-1 β , causando assim níveis aumentados de LDL e consequentemente do colesterol total nos doentes que tomam everolimus. É improvável que everolimus iniba completamente a activação de ERK. Assim, os doentes com os genótipos (-511) (T-T) e (-31) (C-C) de IL-1 β serão capazes de induzir alguma expressão do receptor de LDL. No entanto, aqueles doentes teriam níveis muito baixos de IL-1 β e, assim, menos expressão do receptor de LDL, resultando pois em quantidades mais baixas de colesterol internalizado pelas células e aumento dos níveis de colesterol. Esta explicação seria responsável pelos níveis mais elevados de colesterol observados em doentes com o genótipo (-31) (C-C) de IL-1 β . De forma significativa, os doentes com o genótipo (-511) (T-T) de IL-1 β , correspondendo ao genótipo (-31) (C-C) de IL-1 β , tinha níveis significativamente superiores de LDL ($p = 0,0159$) comparativamente com doentes com outros genótipos de IL-1 β (Figura 3 e Tabela 4).

Identificação e caracterização de SNPs

Podem ser usadas muitas técnicas diferentes para identificar e caracterizar SNPs, incluindo a análise de polimorfismos da conformação de cadeia simples, análise de

heteroduplexes através de cromatografia líquida de alta resolução desnaturante (DHPLC), sequenciação directa do DNA e métodos informáticos. Ver Shi, Clin. Chem., Vol. 47, pp 164-172 (2001). Devido à enormidade de informação de sequências nas bases de dados públicas, podem ser usadas ferramentas computacionais para identificar SNPs *in silico* através do alinhamento de sequências independentemente submetidas para um determinado gene (cDNA ou sequências genómicas). A comparação de SNPs obtidas experimentalmente e por métodos *in silico* mostraram que 55% das SNPs candidatas encontradas com SNPfinder (http://lpg-ws.nci.nih.gov:82/perl/snp_cgi.pl) também foram descobertas experimentalmente. Ver, Cox *et al.*, Hum. Mutal., Vol. 17, pp. 141-150 (2001). No entanto, estes métodos *in silico* foram encontrados em apenas 27% de verdadeiras SNPs.

Actualmente, os métodos de tipagem de SNPs mais comuns incluem hibridação, extensão de sequências iniciadoras e métodos de clivagem. Cada um destes métodos deve ser associado a um sistema de detecção adequado. As tecnologias de detecção incluem polarização fluorescente, (ver Chan *et al.*, Genome Res., Vol.9, pp. 492-499 (1999)), detecção luminométrica da libertação de pirofosfato (pirosequenciação), (ver Ahmadian *et al.*, Anal. Biochem., Vol. 280, pp. 103-110 (2000)), ensaios de clivagem baseados em transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET), DHPLC e espectrometria de massa (ver Shi, Clin. Chem., Vol. 47, pp. 164-172 (2001) e Patente U.S. N° 6 300 076 B1). Outros métodos de detecção e caracterização de

SNPs são os descritos nas Patentes U.S. Nos 6 297 018 e 6 300 063 B1.

Numa realização particularmente preferida, a detecção do polimorfismo pode ser conseguida por meio da chamada tecnologia INVADER™ (disponível na Third Wave Technologies Inc. Madison, WI). Neste ensaio, um oligonucleótido específico "invasor" a montante e uma sonda parcialmente sobreponível a jusante formam em conjunto uma estrutura específica quando ligados a uma matriz de DNA complementar. Esta estrutura é reconhecida e cortada num local específico pela enzima Cleavase e isto resulta na libertação da aba 5' da sonda oligonucleotídica. Este fragmento serve então como oligonucleótido "invasor" relativamente aos alvos secundários sintéticos e sondas secundárias marcadas com um sinal de fluorescência incluídas na mistura reacção. Isto resulta numa clivagem específica das sondas sinal secundárias pela enzima Cleavase. O sinal de fluorescência é gerado quando esta sonda secundária, marcada com moléculas de corante capazes de transferir energia de ressonância fluorescente, é cortada. As Cleavases possuem requisitos restritivos relativamente à estrutura formada pelas sequências de DNA sobreponíveis ou abas e podem, portanto, ser usadas para detectar especificamente desemparelhamentos individuais de pares de bases imediatamente a montante do local de clivagem na cadeia de DNA a jusante. Ver Ryan *et al.*, Molecular Diagnosis, Vol. 4, Nº 2, pp. 135-144 (1999); e Lyamichev *et al.*, Nat. Biotechnol., Vol. 17, pp. 292-296 (1999); ver também as Patentes U.S. Nos 5846717 e 6001567.

Nalgumas realizações, uma composição inclui dois ou mais oligonucleótidos para genotipagem, diferencialmente marcados para simultaneamente despistar a identidade de nucleótidos em dois ou mais locais polimórficos. É igualmente considerado que as composições das sequências iniciadoras podem conter dois ou mais pares de sequências iniciadoras específicas de alelo para permitir atingir e amplificar duas ou mais regiões contendo um local polimórfico.

Os oligonucleótidos para genotipagem de IL-1 β do invento podem também ser imobilizados ou sintetizados sobre uma superfície sólida, como seja um microchip, esfera ou lâmina de vidro (ver, e.g., WO 98/20020 e WO 98/20019). Tais oligonucleótidos de genotipagem imobilizados podem ser usados numa variedade de ensaios de detecção de polimorfismos, incluindo mas não estando limitados a hibridação com sondas e ensaios de extensão com polimerase. Os oligonucleótidos de genotipagem de IL-1 β imobilizados do invento podem compreender um arranjo ordenado de oligonucleótidos, desenhados para rapidamente testar uma amostra de DNA relativamente à presença de polimorfismos em múltiplos genes ao mesmo tempo.

Uma sequência iniciadora oligonucleotídica específica de alelo do invento possui um nucleótido terminal 3' ou, de preferência, um penúltimo nucleótido 3', que é complementar de apenas um nucleótido de uma SNP particular,

actuando assim como uma sequência iniciadora para extensão mediada por polimerase, apenas se o alelo contendo o nucleótido estiver presente. As sequências iniciadoras oligonucleotídicas específicas de alelo, que hibridam com a cadeia codificadora ou não codificadora, forem contempladas pelo invento. Uma sequência iniciadora ASO, para detecção de polimorfismos do gene IL-1 β , foi desenvolvida usando técnicas conhecidas dos familiarizados com a matéria.

Outros oligonucleótidos de genotipagem do invento hibridam com uma região alvo situada entre um e vários nucleótidos a jusante de um dos novos locais polimórficos aqui identificados. Tais oligonucleótidos são úteis em métodos de extensão de sequências iniciadoras mediada por polimerase para a detecção de um dos novos polimorfismos aqui descritos e, portanto, tais oligonucleótidos de genotipagem são aqui referidos como "oligonucleótidos para extensão de sequências iniciadoras". Numa realização preferida, o extremo 3' de um oligonucleótido para extensão de sequências iniciadoras é um desoxinucleótido complementar do nucleótido situado imediatamente adjacente do local polimórfico.

Numa outra realização, o invento proporciona um estojo ("kit") compreendendo pelo menos dois oligonucleótidos de genotipagem em recipientes separados. O estojo ("kit") pode também conter outros componentes tais como tampão de hibridação (em que os oligonucleótidos são usados como sondas) embalados em recipientes separados. Como

alternativa, sempre que os oligonucleótidos sejam para usar na amplificação de uma região alvo, o estojo ("kit") pode conter, embalados em recipientes separados, uma polimerase e um tampão de reacção optimizado para a extensão de sequências iniciadoras mediada pela polimerase, como seja PCR. As composições de oligonucleótidos e estojos ("kits") atrás descritos são úteis em métodos para a genotipagem e/ou haplotipagem do gene de IL-1 β num indivíduo.

Como aqui é usado, o termo "haplotipo relativamente ao gene IL-1 β " deverá referir-se ao haplotipo que consiste na combinação dos polimorfismos nas posições -511 e -31 do gene IL-1 β e estes haplotipos deverão ser designados na forma que se segue; os haplotipos deverão ser designados "colesterol elevado" se o polimorfismo C para T no local polimórfico -511 do gene IL-1 β (posição 1423 da sequência X04500) e o polimorfismo T para C no local polimórfico -31 do gene IL-1 β (posição 1903 da sequência X04500) estiverem presentes numa cópia do gene IL-1 β . Pelo contrário, o haplotipo deverá ser designado "baixo colesterol" se ambos os polimorfismos não estiverem presentes numa determinada cópia do gene IL-1 β e portanto o nucleótido no local -31 deste gene IL-1 β é um T e o nucleótido no local -511 é um C neste gene IL-1 β no cromossoma referido.

Uma realização do método de genotipagem envolve o isolamento a partir do indivíduo de uma mistura de ácidos nucleicos compreendendo as duas cópias do gene IL-1 β , ou um seu fragmento, que estão presentes no indivíduo e deter-

minação da identidade do par de nucleótidos num ou mais locais dos locais polimórficos nas duas cópias para atribuir um genótipo de IL-1 β ao indivíduo. Como será facilmente compreendido pelos familiarizados com a matéria, as duas "cópias" de um gene num indivíduo podem ser do mesmo alelo ou podem ser alelos diferentes. Numa realização particularmente preferida, o método de genotipagem compreende a determinação da identidade do par de nucleótidos em cada local polimórfico.

Tipicamente, a mistura de ácidos nucleicos ou proteína é isolada a partir de uma mostra biológica retirada do indivíduo, como seja uma amostra de sangue ou amostra de tecido. As amostras de tecidos adequadas incluem sangue total, sémen, saliva, lágrimas, urina, material fecal, suor, esfregaços bucais, pele e biopsias de órgãos específicos, tais como músculo ou tecido nervoso e cabelo. A mistura de ácidos nucleicos pode ser constituída por DNA genómico, poli-ribonucleótido mensageiro (mRNA) ou cDNA e, nos dois últimos casos, a amostra biológica deve ser obtida a partir de um órgão em que o gene IL-1 β é expresso. Ainda, será compreendido pelos familiarizados com a matéria que as preparações de mRNA ou de cDNA não serão usados para detectar polimorfismos situados em intrões, nas regiões não transcritas 5' e 3' ou nas regiões do promotor. Se for isolado um fragmento do gene IL-1 β , deverá conter um ou mais locais polimórficos a serem genotipados.

Uma realização do método de genotipagem compre-

ende o isolamento a partir do indivíduo de uma molécula de ácido nucleico contendo apenas uma das duas cópias do gene IL-1 β , ou um seu fragmento, que está presente no indivíduo e determinação nessa cópia da identidade do nucleótido num ou mais dos locais polimórfico nessa cópia para atribuir um haplotipo de IL-1 β ao indivíduo. O ácido nucleico pode ser isolado usando qualquer método capaz de separar as duas cópias do gene IL-1 β , ou um seu fragmento, incluindo mas não estando limitado a um dos métodos descritos atrás para a preparação de isogenes de IL-1 β , sendo a clonagem dirigida *in vivo* a abordagem preferida.

Como será facilmente avaliado pelos familiarizados com a matéria, qualquer clone individual proporcionará apenas informação sobre o haplotipo numa das duas cópias do gene IL-1 β presente num indivíduo. Se a informação sobre o haplotipo for pretendida para a outra cópia do indivíduo, será necessário examinar outros clones de IL-1 β . Tipicamente, pelo menos cinco clones deverão ser analisados para se ter mais de 90% de probabilidade de haplotipagem de ambas as cópias do gene IL-1 β num indivíduo. Numa realização particularmente preferida, é identificado o nucleótido em cada local polimórfico.

Numa realização preferida, um par de haplotipos de IL-1 β é determinado para um indivíduo através da identificação da sequência em fase de nucleótidos num ou mais dos locais polimórficos em cada cópia do gene IL-1 β que está presente no indivíduo. Numa realização particular-

mente preferida, o método de haplotipagem compreende a identificação da sequência em fase de nucleótidos em cada um dos locais polimórficos em cada uma das cópias do gene IL-1 β . Quando da haplotipagem de ambas as cópias do gene, o passo de identificação é, de preferência, realizado com cada cópia do gene a ser colocada em recipientes separados. No entanto, é também concebido que se as duas cópias forem marcadas com marcadores diferentes, ou forem separadamente distinguidos ou identificados, poderá ser possível nalguns casos realizar o método usando um mesmo contentor. Por exemplo, se as primeira e segunda cópias do gene forem marcadas com um primeiro e um segundo corantes fluorescentes diferentes, respectivamente, e um oligonucleótido específico de alelo marcado com um terceiro corante fluorescente diferente for usado para testar um ou mais locais polimórficos, então a detecção de uma combinação do primeiro e terceiro corante deverá identificar o polimorfismo na primeira cópia do gene enquanto a detecção de uma combinação dos segundo e terceiro corantes identificará o polimorfismo na segunda cópia do gene.

Em ambos os métodos de genotipagem e de haplotipagem, pode ser determinada a identidade de um nucleótido (ou par de nucleótidos), num ou mais locais polimórficos, através da amplificação de uma ou mais regiões alvo contendo um ou mais locais polimórficos directamente a partir de uma ou de ambas as cópias do gene IL-1 β , ou seu fragmento, e a sequência de uma ou mais regiões amplificadas determinada por métodos convencionais. Será facil-

mente entendido pelos familiarizados com a matéria que o mesmo nucleótido será detectado duas vezes num local polimórfico em indivíduos que sejam homozigóticos nesse local, enquanto dois nucleótidos diferentes serão detectados se o indivíduo for heterozigótico relativamente a esse local. O polimorfismo pode ser identificado directamente, conhecido como identificação do tipo positivo, ou por inferência, referido como identificação do tipo negativo. Por exemplo, sempre que se saiba que um SNP é guanina e citosina numa população de referência, um local pode ser determinado positivamente como sendo guanina ou citosina para todos os indivíduos homozigóticos naquele local, ou guanina e citosina, se o indivíduo for heterozigótico nesse local. Como alternativa, o local pode ser determinado negativamente como não sendo guanina (e assim citosina/citosina) ou não citosina (e assim guanina/guanina).

Ainda, a identidade dos alelos presentes em quaisquer locais polimórficos aqui descritos pode ser determinada indirectamente através de genotipagem de um local polimórfico não descrito aqui que esteja em desequilíbrio de ligação com o local polimórfico de interesse. Dois locais são referidos como estando em desequilíbrio de ligação se a presença de uma variante particular num local aumentar a predictibilidade de uma outra variante no segundo local. Ver Stevens, Mol. Diag., Vol. 4, pp. 309-317 (1999). Os locais polimórficos em desequilíbrio de ligação com os locais polimórficos aqui descritos podem estar localizados em regiões do gene ou noutras regiões genómicas

não avaliadas aqui. A genotipagem de um local polimórfico em desequilíbrio de ligação com os novos locais polimórficos aqui descritos pode ser realizada através de qualquer um dos métodos atrás referidos, mas não lhes estando limitados, para a detecção da identidade do alelo num local polimórfico.

A região alvo pode ser amplificada usando qualquer método de amplificação dirigida por oligonucleótidos, incluindo mas não estando limitado a reacção em cadeia da polimerase (PCR) (Patente U.S. N° 4965188), reacção em cadeia da ligase (LCR) (ver Barany *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp 189-193); e WO 90/01069) e o ensaio de ligação de oligonucleótidos (OLA) (ver Landgren *et al.*, Science, Vol. 241, pp. 1077-1080 (1988)). Os oligonucleótidos úteis como sequências iniciadoras ou sondas em tais métodos deverão especificamente hibridar com uma região do ácido nucleico que contenha o local polimórfico ou lhe seja adjacente. Tipicamente, os oligonucleótidos possuem entre 10 e 35 nucleótidos de comprimento e, de preferência, entre 15 e 30 nucleótidos de comprimento. Mais de preferência, os oligonucleótidos têm 20-25 nucleótidos de comprimento. O comprimento exacto do oligonucleótido dependerá de muitos factores que são de rotina considerados e executados pelos familiarizados com a matéria.

Outros processos conhecidos de amplificação de ácidos nucleicos podem ser utilizados para amplificar a

região alvo, incluindo sistemas de amplificação baseados em transcrição (ver Patentse U.S. Nos 5130238 e 5169766; EP 329822; e WO 89/06700) e métodos isotérmicos. Ver Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 392-396 (1992).

Um polimorfismo na região alvo pode também ser avaliado antes ou após amplificação usando um dos vários métodos baseados em hibridação conhecidos na área. Tipicamente, os oligonucleótidos específicos de alelo são utilizados na execução de tais métodos. Os oligonucleótidos específicos de alelo podem ser usados como pares de sondas diferencialmente marcadas, com um membro do par apresentando uma correspondência perfeita com uma variante de uma sequência alvo e o outro membro mostrando uma correspondência perfeita com uma variante diferente. Nalgumas realizações, mais de um local polimórfico pode ser detectado de uma só vez usando uma série de oligonucleótidos ou pares de oligonucleótidos específicos de alelo. De preferência, os membros da série possuem temperaturas de fusão dentro de 5°C, e mais de preferência dentro de 2°C, um do outro quando da hibridação com cada um dos locais polimórficos a serem detectados.

A hibridação de um oligonucleótido específico de alelo com um polinucleótido alvo pode ser realizada com ambas as entidades em solução ou tal hibridação pode ser realizada quando o oligonucleótido ou polinucleótido alvo está covalentemente ou não covalentemente fixado a um

suporte sólido. A ligação pode ser mediada, por exemplo, através de interações anticorpo-antigénio, poli-L-lisina, estreptavidina ou avidina-biotina, pontes de sal, interações hidrofóbicas, ligações químicas, ligação cruzada com UV, etc. Os oligonucleótidos específicos de alelo podem ser sintetizados directamente no suporte sólido ou ligados ao suporte sólido subsequentemente à síntese. Suportes sólidos adequados para usar nos métodos de detecção do invento incluem substratos feitos de silicone, vidro, plástico, papel e similares, que podem ser formados, por exemplo, nos alvéolos (como placas de 96 alvéolos), lâminas, folhas, membranas, fibras, chips, placas e esferas. O suporte sólido pode ser tratado, revestido ou derivatizado para facilitar a imobilização do oligonucleótido específico de alelo ou ácido nucleico alvo.

O genótipo ou haplotipo para o gene IL-1 β de um indivíduo pode também ser determinado através de hibridação de uma amostra de ácido nucleico, contendo uma ou ambas as cópias do gene, com arranjos e sub-arranjos de ácidos nucleicos como descrito em WO 95/11995. Os arranjos conterão uma bateria de oligonucleótidos específica de alelo representando cada um dos locais polimórficos a serem incluídos no genótipo ou haplotipo.

A identidade ou polimorfismos podem também ser determinados usando uma técnica de detecção de não correspondência, incluindo o método de protecção de RNase usando ribo-sondas (ver Winter *et al.*, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, Vol. 82, p. 7575 (1985); e Meyers *et al.*, Science, Vol. 230, p. 1242 (1985)) mas não lhe estando limitados, e proteínas que reconhecem não correspondências de nucleótidos, como seja a proteína mutS de *E. coli*. Ver Modrich, Ann. Ver. Genet., Vol. 25, pp. 229-253 (1991). Como alternativa, as variantes dos alelos podem ser identificadas através da análise de polimorfismos de cadeia simples conformacionais (SSCP) (ver Orita *et al.*, Genomics, Vol. 5, pp. 874-879 (1989); e Humphries *et al.*, Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Elles, Ed., pp. 321-340 (1996)) ou electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Ver Wartell *et al.*, Nucl. Acids Res., Vol. 18, pp. 2699-2706 (1990) e Sheffield *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp. 232-236 (1989).

Um método de extensão de sequências iniciadoras mediada por polimerase pode também ser usado para identificar os polimorfismos. Vários desses métodos foram descritos na literatura de patentes e científica e incluem o método "Genetic Bit Analysis" (WO 92/15712) e a análise de fragmento genético mediado por ligase/polimerase (Patente U.S. N° 5679524). Métodos relacionados estão descritos em WO 91/02087, WO 90/09455, WO 95/17676, Patentes U.S. Nos 5302509 e 5945283. As sequências iniciadoras prolongadas contendo um polimorfismo podem ser detectadas por espectrometria de massa como descrito na Patente U.S. N° 5605798. Um outro método de extensão de uma sequência iniciadora é o PCR específico de alelo. Ver Ruafio *et al.*, Nucl. Acids Res., Vol. 17, p. 8392 (1989); Ruafio *et al.*,

Nucl. Acids Res., Vol. 19, pp. 6877-6882 (1991); WO 93/22456; e Turki et al., J. Clin. Invest., Vol.95, pp. 1635-1641 (1995). Ainda, múltiplos locais polimórficos podem ser estudados amplificando simultaneamente múltiplas regiões do ácido nucleico usando séries de sequências iniciadoras específicas de alelo como descrito em Wallace et al. (WO 89/10414).

Numa realização preferido, os dados de frequência de haplotipos para cada grupo etnográfico são analisados para determinar se é consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (ver Hartl et al., Principles of Population Genomics, Sinauer Associates, 3rd Edition, Sunderland, MA (1997)), postula que a frequência de encontrar o par de haplotipos H_1/H_2 é igual a $P_{H-W}(H_1/H_2) = 2p(H_1) p(H_2)$ se $H_1 \neq H_2$ e $P_{H-W}(H_1/H_2) = 2p(H_1) p(H_2)$ se $H_1 = H_2$. Uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências de haplotipos observada e esperada poderá ser devida a um ou mais factores, incluindo significativa consanguinidade no grupo populacional, forte pressão selectiva no gene, enviesamento da amostragem e/ou erros no processo de genotipagem. Caso sejam observados maiores desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg num grupo etnográfico, o número de indivíduos naquele grupo poderá ser aumentado para ver se o desvio é devido a um enviesamento da amostragem. Se um maior tamanho da amostra não reduzir a diferença entre as frequências do par de haplotipos observada e esperada, então pode-se pretender considerar haplotipagem do indivíduo usando um método de

haplotipagem directo como seja, por exemplo, a tecnologia CLASPER System™ (Patente U.S. N° 5866404), SMD ou PCR de gama larga específico de alelo. Ver Michalotos-Beloin *et al.*, Nucl. Acids Res., Vol. 24, pp. 4841-4843 (1996).

Numa realização deste método para a previsão de um par de haplotipos de IL-1 β , o passo de classificação envolve a realização da análise que se segue. Primeiro, cada um dos pares de haplotipos possíveis é comparado com os pares de haplotipos na população de referência. De um modo geral, apenas um dos pares de haplotipos na população de referência apresenta concordância com um par de haplotipos possível e esse par é atribuído ao indivíduo. Ocasionalmente, apenas um haplotipo representado nos pares de haplotipos de referência é consistente com um par de haplotipos possível para um indivíduo e em tais casos é atribuído ao indivíduo um par de haplotipos contendo este haplotipo conhecido e um novo haplotipo derivado da subtracção do haplotipo conhecido do possível par de haplotipos. Em casos raros, nenhum haplotipo na população de referência é consistente com os possíveis pares de haplotipos ou, como alternativa, múltiplos pares de haplotipos de referência são consistentes com os pares de haplotipos possíveis. Em tais casos, o indivíduo é, de preferência, haplotipado usando um método de haplotipagem molecular directo como seja, por exemplo, a tecnologia CLASPER System™ (Patente U.S. N° 5866404), SMD ou PCR de gama larga específico de alelo. Ver Michalotos-Beloin *et al.*, *supra*.

Glossário

Alelo Uma forma particular de um gene ou sequência de DNA numa localização cromossômica específica (*locus*).

Anticorpos Inclui anticorpos policlonais e monoclonais, quiméricos, de cadeia simples e anticorpos humanizados, assim como fragmentos Fav, incluindo os produtos de uma biblioteca de expressão de Fav ou de imunoglobulinas.

Gene candidato Um gene que é apontado como sendo responsável por uma doença, condição ou resposta a um tratamento, ou que se pretenda correlacionar com uma destas.

Genótipo completo A sequência de 5' para 3' sem estar em fase, encontrada em todos os locais polimórficos conhecidos num *locus* num par de cromossomas homólogos num indivíduo.

Haplotipo completo A sequência 5' para 3' de nucleótidos encontrados em todos os locais polimórficos conhecidos num *locus* num cromossoma individual derivado de um indivíduo.

Gene Um segmento de DNA que possui toda a informação para a biossíntese regulada de um produto de RNA,

incluindo promotores, exões, intrões e outras regiões não traduzidas que controlam a expressão.

Genótipo Uma sequência 5' para 3' de um ou mais pares de nucleótidos encontrados num ou mais locais polimórficos num *locus* num par de cromossomas homólogos num indivíduo. Como aqui é usado, o genótipo inclui um genótipo completo e/ou subgenótipo como descrito abaixo.

Genotipagem Um processo para a determinação de um genótipo de um indivíduo.

Haplotipo Uma sequência 5' para 3' dos nucleótidos encontrados num ou mais locais polimórficos em ligação num *locus* num cromossoma individual de um indivíduo.

Dados de haplotipos Informação respeitante a um ou mais dos seguintes parâmetros relativa a um gene específico: uma listagem dos pares de haplotipos em cada indivíduo numa população; uma listagem dos diferentes haplotipos numa população; frequência de cada haplotipo naquela ou noutras populações e quaisquer associações conhecidas entre um ou mais haplotipos e uma característica.

Par de haplotipos Dois haplotipos encontrados para um *locus* num indivíduo.

Haplotipagem Um processo para a determinação de um ou mais haplotipos num indivíduo e inclui a árvore

genealógica familiar, técnicas moleculares e/ou inferência estatística.

Homólogo Um termo genérico usado na área para indicar uma sequência polinucleotídica ou polipeptídica possuindo um elevado grau de relacionamento da sequência com uma sequência de referência. Tal relacionamento pode ser quantificado através da determinação do grau de identidade e/ou similaridade entre as duas sequências como aqui definido. Dentro deste termo genérico incluem-se os termos "ortólogo" e "paralógo".

Identidade Uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas ou duas ou mais sequências polinucleotídicas, determinada através da comparação das sequências. Em geral, a identidade refere-se a uma correspondência exacta nucleótido a nucleótido ou aminoácido a aminoácido das duas sequências polinucleotídicas ou das duas sequências de aminoácidos, respectivamente, ao longo das sequências a serem comparadas.

Isoforma Uma forma particular de um gene, mRNA, cDNA ou a proteína codificada por eles, distinta de outras formas pela sua sequência e/ou estrutura particular.

Isogene Uma das isoformas de um gene encontrado numa população. Um isogene possui todos os polimorfismos presentes na isoforma particular do gene.

Isolado Quando aplicado a uma molécula biológica, como seja RNA, DNA, oligonucleótido ou proteína; isolado significa a molécula substancialmente livre de outras moléculas biológicas, como sejam ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, açúcares ou outro material, como sejam detritos celulares e meio de crescimento. De um modo geral, o termo "isolado" não se destina a referir uma ausência completa de tal material ou ausência de água, tampões ou sais, a menos que estejam presentes em quantidades que substancialmente interferem com os métodos do presente invento.

Ligação Descreve a tendência de genes para serem herdados em conjunto como resultado da sua localização no mesmo cromossoma; medido por percentagem de recombinação entre *loci*.

Desequilíbrio de ligação Descreve uma situação em que algumas combinações de marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente na população do que seria de esperar pela sua distância de separação. Implica que um grupo de marcadores foi herdado coordenadamente. Pode resultar de recombinação reduzida na região ou de um efeito fundador, em que não há tempo suficiente para atingir equilíbrio uma vez que uma das marcas foi introduzida na população.

Locus Uma localização num cromossoma ou molécula de DNA, correspondendo a um gene ou uma característica física ou fenotípica.

Bases modificadas Incluem, *e.g.*, bases tritiladas e bases invulgares, tais como inosina. Pode ser feita uma variedade de modificações no DNA e RNA; assim, polinucleótido inclui formas modificadas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente dos polinucleótidos tipicamente encontrados na natureza, assim como as formas químicas de DNA e RNA características de vírus e células. Polinucleótido também engloba polinucleótidos relativamente curtos, muitas vezes referidos como oligonucleótidos.

Natural Um termo usado para designar que o objecto é aplicado a, *e.g.*, polinucleótido ou polipéptido natural, o qual pode ser isolado a partir de uma fonte na natureza e não foi intencionalmente modificado pelo homem.

Par de nucleótidos Os nucleótidos encontrados num local polimórfico nas duas cópias de um cromossoma de um indivíduo.

Ortólogo Um polinucleótido ou polipéptido que é o equivalente funcional do polinucleótido ou polipéptido noutras espécies.

Paralógo Um polinucleótido ou polipéptido dentro da mesma espécie que é funcionalmente semelhante.

Em fase Quando aplicado a uma sequência de pares de nucleótidos para dois ou mais locais polimórficos num *locus*, em fase significa que é conhecida a combinação de

nucleótidos presentes nesses locais polimórficos numa única cópia do *locus*.

Local polimórfico (PS) Uma posição dentro de um *locus* no qual pelo menos duas sequências alternativas são encontradas numa população, a mais frequente das quais tem uma frequência não superior a 99%.

Variante polimórfica Um gene, mRNA, cDNA, polipéptido ou péptido cuja sequência de nucleótidos ou de aminoácidos difere de uma sequência de referência devido à presença de um polimorfismo no gene.

Polimorfismo Qualquer sequência variante presente numa frequência >1% numa população. A variação da sequência observada num indivíduo num local polimórfico. Os polimorfismos incluem substituições, inserções, deleções de nucleótidos e micro-satélites e pode, mas não é necessário que tal aconteça, resultar em diferenças detectáveis na expressão do gene ou função da proteína.

Dados de polimorfismos Informação respeitante um gene específico relativa a um ou mais dos seguintes parâmetros: localização de locais polimórficos; variação da sequência naqueles locais; frequência de polimorfismos numa ou mais populações; os diferentes genótipos e/ou haplotipos determinados para o gene; frequência de um ou mais destes genótipos e/ou haplotipos numa ou mais populações; qualquer associação conhecida entre uma característica e um genótipo ou um haplotipo do gene.

Dados de bases de polimorfismos Uma colecção de dados de polimorfismos arranjados numa forma sistemática ou metódica e capaz de ser acedida individualmente por meios electrónicos ou outros.

Polinucleótido Qualquer RNA ou DNA, que pode ser RNA ou DNA modificado ou não. Os polinucleótidos incluem, sem limitações, DNA de cadeia simples e dupla, DNA que é uma mistura de regiões de cadeia simples e de cadeia dupla, RNA de cadeia simples e de cadeia dupla e RNA que é uma mistura de regiões de cadeia simples e de cadeia dupla, moléculas híbridas compreendendo DNA e RNA que pode ser de cadeia simples ou, mais tipicamente, de cadeia dupla ou uma mistura de regiões de cadeia simples e de cadeia dupla. Ainda, os polinucleótidos referem-se a regiões de cadeia tripla compreendendo RNA ou DNA ou RNA e DNA. O termo polinucleótido também inclui DNAs ou RNAs contendo uma ou mais bases modificadas e DNAs ou RNAs com estruturas modificadas por questões de estabilidade ou por outras razões.

Polipéptido Qualquer polipéptido compreendendo dois ou mais aminoácidos ligados um ao outro por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, *i.e.*, isómeros de péptidos. Polipéptido refere-se a cadeias curtas, normalmente referidas como péptidos, oligopéptidos ou oligómeros, e a cadeias mais longas, de um modo geral referidas como proteínas. Os polipéptidos podem conter aminoácidos diferentes dos 20 aminoácidos codificados por genes.

Os polipéptidos incluem sequências de aminoácidos modificadas por processos naturais, tais como processamento pós-tradução, como seja processamento pós-tradução ou por técnicas de modificação química que são conhecidas na área. Tais modificações estão bem descritas nos textos básicos e em monografias mais detalhadas, assim como em numerosa literatura de investigação.

Grupo populacional Um grupo de indivíduos que partilha uma característica comum, como seja origem etno-geográfica, condição médica, resposta a tratamento, etc.

População de referência Um grupo de indivíduos que se prevê serem representativos de uma ou mais características do grupo populacional. Tipicamente, a população de referência representa a variação genética na população num nível de certeza de pelo menos 85%, de preferência pelo menos 90%, mais de preferência pelo menos 95% e, mesmo mais de preferência, pelo menos 99%.

Polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) A ocorrência de variabilidade de nucleótidos numa posição nucleotídica individual no genoma, dentro de uma população. Um SNP pode ocorrer dentro de um gene ou dentro de regiões intergénicas do genoma. SNPs podem ser testados usando Amplificação Específica de Alelo (ASA). Para o processo são necessárias pelo menos 3 sequências iniciadoras. Uma sequência iniciadora comum é usada no complemento reverso do polimorfismo a ser testado. Esta sequência iniciadora comum pode distar entre 50 e 1500 pb da base polimórfica.

As outras duas (ou mais) sequências iniciadoras são idênticas umas às outras, excepto a base final 3' variar para corresponder a um dos dois (ou mais) alelos que constituem o polimorfismo. Duas (ou mais) reacções de PCR são então realizadas numa amostra de DNA, cada uma delas usando a sequência iniciadora comum e uma das Sequências Iniciadoras Específicas do Alelo.

Variante de "splicing" As moléculas de cDNA produzidas a partir de moléculas de RNA inicialmente transcritas a partir da mesma sequência de DNA genómica mas que sofreram "splicing" alternativo do RNA. O "splicing" alternativo ocorre quando um transcripto de RNA primário sofre "splicing", de um modo geral para a remoção de intrões, o que resulta na produção de mais de uma molécula de mRNA, cada uma delas pode codificar diferentes sequências de aminoácidos. O termo "variante de splicing" também se refere às proteínas codificadas pelas moléculas de cDNA atrás descritas.

Sub-fenótipo A sequência de nucleótidos de 5' para 3', sem estar em fase, numa sub-série de locais polimórficos conhecidos num *locus* de um par de cromossomas homólogos de um indivíduo.

Sub-haplotipo A sequência de nucleótidos de 5' para 3' observada numa sub-série de locais polimórficos conhecidos num *locus* de um determinado cromossoma de um indivíduo.

Indivíduo Um indivíduo humano cujos genótipos ou haplotipos ou resposta a tratamento ou estado de doença se pretende determinar.

Tratamento Um estímulo administrado internamente ou externamente a um indivíduo.

Não em fase Quando aplicado a uma sequência de pares de nucleótidos para dois ou mais locais polimórficos num *locus*, não em fase significa que se desconhece a combinação de nucleótidos presentes nesses locais polimórficos numa cópia individual do *locus*. Ver também, Human Molecular Genetics, 2nd Edition. Tom Strachan and Andrew P. Read. John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York, 1999.

Referências citadas

A discussão de referências apresentadas destina-se apenas a resumir as conclusões feitas pelos seus autores e não se assume que qualquer referência constitui trabalho anterior.

O presente invento não está limitado em termos das realizações particulares descritas no pedido de patente, que se destinam a serem ilustrações de aspectos individuais do invento. O presente invento apenas está limitado pelos termos das reivindicações apenas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Sridar Kudaravalli
Rosarelis Torres
Curt Wolfgang
Michael Polymeropoulos
Novartis AG

<120> Métodos para prever aumentos de colesterol durante terapia imunossupressora

<130> 4-32702A/USN

<150> US60/415123

<151> 2002-09-30

<160> 8

<170> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> sequência artificial

<400> 1

gcagagctca tctggcattg

20

<170> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> sequência artificial

<400> 2

tatgtgggac aaagtggaag

20

<170> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> sequência artificial

<400> 3

gcacaacgat tgtcaggaaa ac

22

<170> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> sequência artificial

<400> 4

atgcatacac acaaagaggc ag

22

<170> 5

<211> 55

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5
ctgcaattga cagagagctc ccgaggcaga gaacagcacc caaggtagag accca 55

<170> 6
<211> 55
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
ctgcaattga cagagagctc ctgaggcaga gaacagcacc caaggtagag accca 55

<170> 7
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
tcctacttct gcttttgaaa gccataaaaa cagcgaggga gaaactggca gataccaaac 60
ctc 63

<170> 8
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
tcctacttct gcttttgaaa gctataaaaa cagcgaggga gaaactggca gataccaaac 60
ctc 63

Lisboa, 11 de Junho de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Um método *in vitro* para determinar o grau de aumento de colesterol sérico que ocorrerá num doente durante o tratamento com uma medicação imunossupressora, compreendendo a determinação, para as duas cópias do gene IL-1 β presente no doente, da identidade de um par de nucleótidos seleccionado do grupo consistindo no par de nucleótidos no local polimórfico -511 C \rightarrow T (na posição 1423 da sequência X04500) do gene IL-1 β e classificação do doente num grupo de aumento elevado de colesterol se ambos os pares forem AT, classificação do doente num grupo de aumento intermédio de colesterol se um dos pares for AT e o outro for GC e classificação do doente num grupo de aumento baixo de colesterol se ambos os pares forem GC; e o par de nucleótidos no local polimórfico -31 T \rightarrow C (posição 1903 da sequência X04500) do gene IL-1 β e classificação do doente num grupo de aumento elevado de colesterol se ambos os pares forem GC, classificação do doente num grupo de aumento intermédio de colesterol se um dos pares for AT e o outro for GC e classificação do doente num grupo de aumento baixo de colesterol se ambos os pares forem AT.

2. O método da reivindicação 1, compreendendo ainda:

- a) determinação, para as duas cópias do cromossoma contendo o gene IL-1 β presente no doente, do

haplotipo consistindo na combinação de polimorfismos na posição -511 e do polimorfismo na posição -31 do gene IL-1 β e,

- b) classificação do doente num grupo de aumento elevado de colesterol se ambas as referidas cópias possuírem o haplotipo "colesterol elevado" e
- c) classificação do doente num grupo de aumento intermédio de colesterol se uma das referidas cópias possuir o haplotipo "colesterol elevado" e a outra possuir o haplotipo "colesterol baixo" e
- d) classificação do doente como um grupo de aumento baixo de colesterol se ambas as cópias referidas possuírem o haplotipo "colesterol baixo".

3. O método das reivindicações anteriores em que o processo de determinação da identidade do par de nucleótidos ou do haplotipo compreende a detecção de SNPs algures no referido cromossoma que estejam em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo -511 ou com o polimorfismo -31 no gene IL-1 β e usando a relação de uma ou mais das referidas SNPs para determinar a natureza do par de nucleótidos ou haplotipo com interesse.

4. Utilização de um imunossupressor em combinação com uma medicação que baixe o colesterol para a preparação de um medicamento para o tratamento de um doente

com um aumento de colesterol sérico, induzido por um imunossupressor, associado a um polimorfismo no gene IL-1 β , em que o polimorfismo é seleccionado do grupo consistindo num local polimórfico -511 C \rightarrow T (posição 1423 da sequência X04500) do gene IL-1 β e num local polimórfico -31 T \rightarrow C (posição 1903 da sequência X04500) do gene IL-1 β , os polimorfismos sendo determinados para duas cópias do gene IL-1 β ; e em que o doente tem, se o local polimórfico for -511 C \rightarrow T, um par que é AT e um par que é GC, ou ambos os pares que são AT; ou se o local polimórfico for -31 T \rightarrow C, um par que é AT e um par que é GC, ou ambos os pares que são CG.

5. A utilização da reivindicação 4, em que o imunossupressor é seleccionado do grupo consistindo em Rapamicina (sirolimus, RAPAMUNETM), Everolimus (CERTICANTM) (RAD), Ácido micofenólico e Mofetil Micofenolato (CELLCEPTTM) (MMF), Azatioprina (IMURANTM), Ciclosporina (NEORALTM) e Tacrolimus (PROGRAFTM).

6. A utilização da reivindicação 4, em que o imunossupressor é everolimus.

7. A utilização das reivindicações 4, 5 ou 6, em que a medicação para baixar o colesterol é seleccionada do grupo consistindo em Colestipol (COLESTIDTM), Clofibrato (ATROMID-STM), Gemfibrozil (LOPIDTM), Fenofibrato (TRICORTM), Fluvastatina (LESCOLTM), Atorvastatina (LIPITORTM), Lovastatina (MEVACORTM), Pravastatina (PRAVACOLTM), Simvastatina (ZOCORTM) e Niacina (NIASPANTM).

8. Utilização de um estojo ("kit") para determinar o aumento de colesterol sérico numa amostra, o referido estojo ("kit") compreendendo:

- a) um recipiente contendo pelo menos um reagente específico para a detecção da natureza do par de nucleótidos num local polimórfico do gene IL-1 β seleccionado do grupo constituído pelo local polimórfico -511 do gene IL-1 β e pelo local polimórfico -31 do gene IL-1 β ; e
- b) instruções para as opções de tratamento recomendadas, baseadas na natureza do referido par de nucleótidos.

9. Utilização da reivindicação 8, o referido estojo ("kit") compreendendo ainda instruções para a determinação da natureza do haplotipo do gene IL-1 β a partir dos resultados do estojo ("kit") atrás referido e instruções para opções de tratamento recomendadas, baseadas na natureza do haplotipo indicado.

Lisboa, 11 de Junho de 2008

Figura 1. Média LS dos níveis de colesterol total, comparados os genótipos (-511) IL-1B CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados dentro do ensaio clínico RAD B251

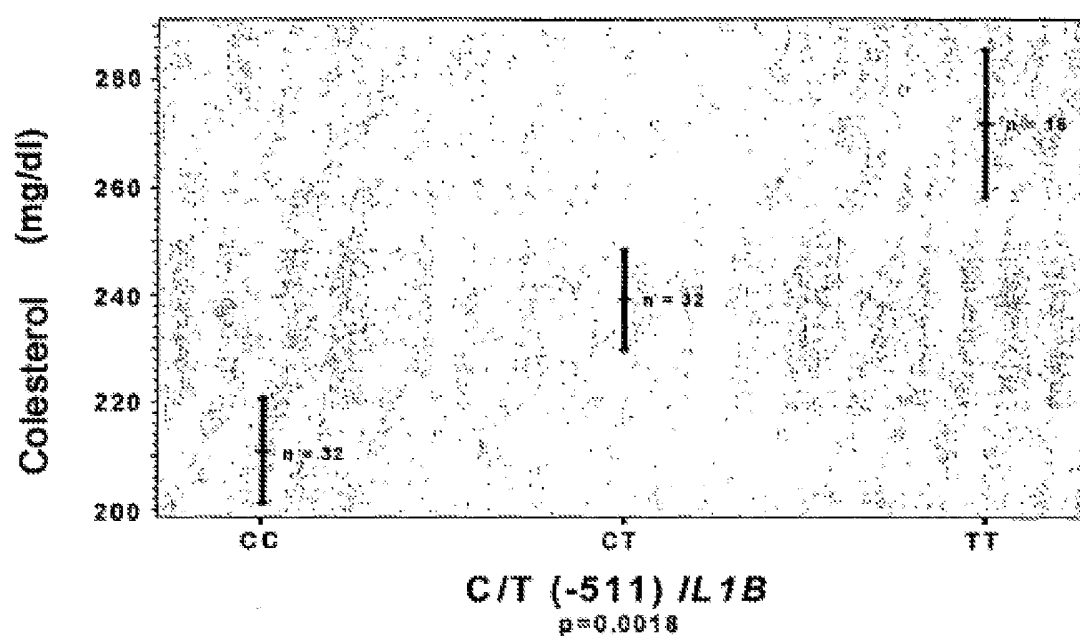


Figura 2 LS dos níveis de colesterol total, comparados os genótipos em todos os grupos de tratamento combinados dentro do ensaio clínico RAD B251

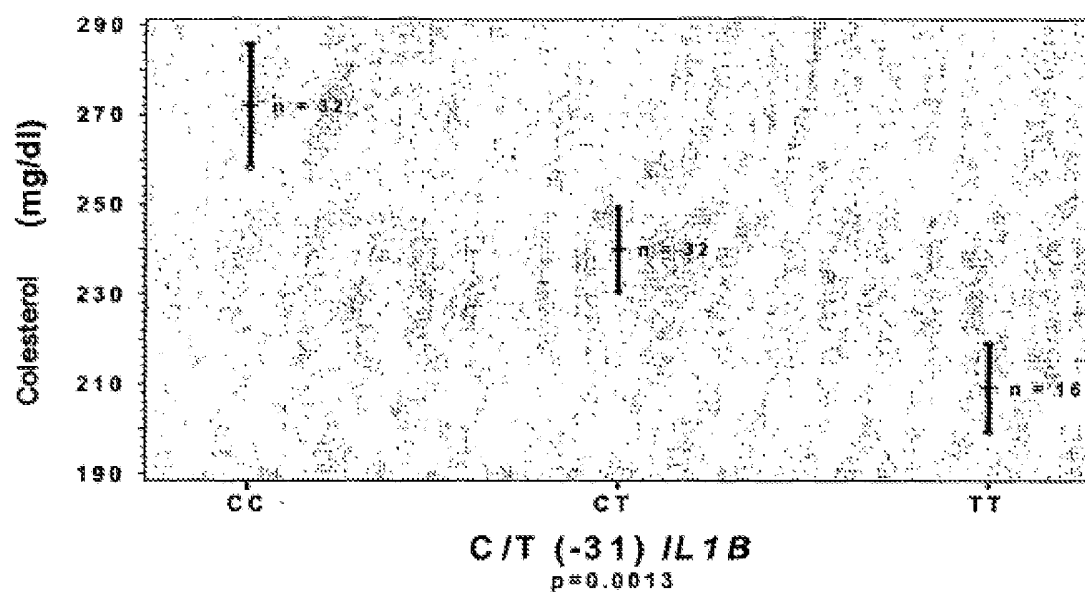


Figura 3. Média LS dos níveis de colesterol HDL, comparados os genótipos (-511) IL-1B CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B51

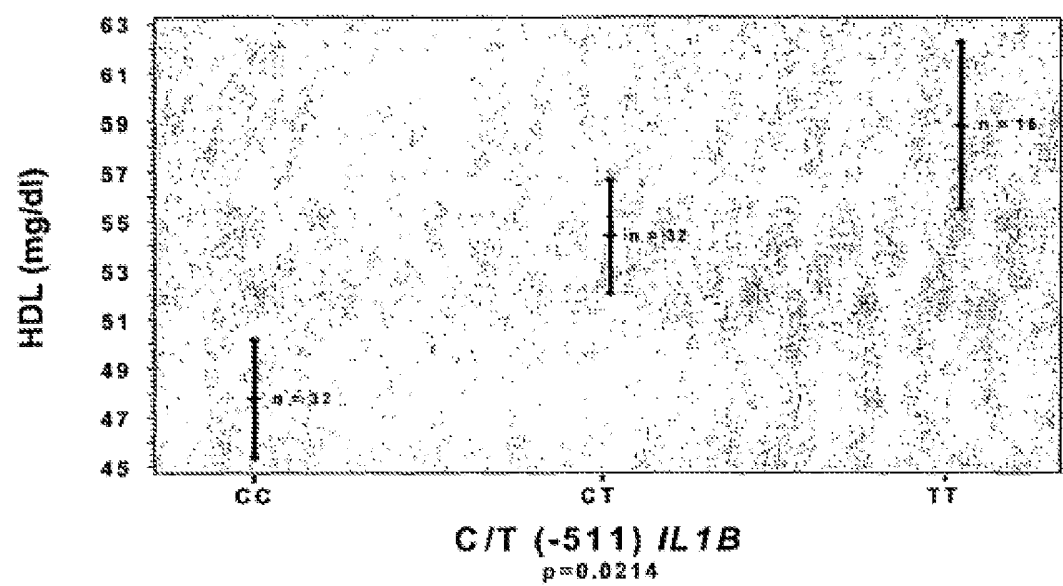


Figura 4. Média LS dos níveis de colesterol HDL, comparados os genótipos (-3) IL-1B CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento combinados no ensaio clínico RAD B251

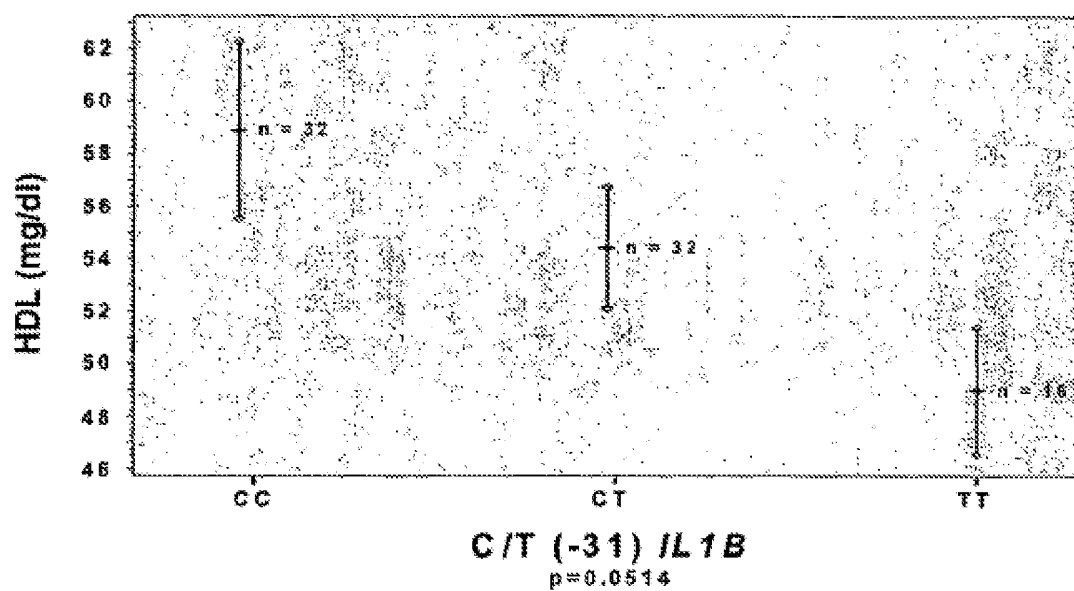


Figura 5. Média LS dos níveis de colesterol LDL comparados os genótipos (-511) IL-1B CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento no ensaio clínico RAD B251

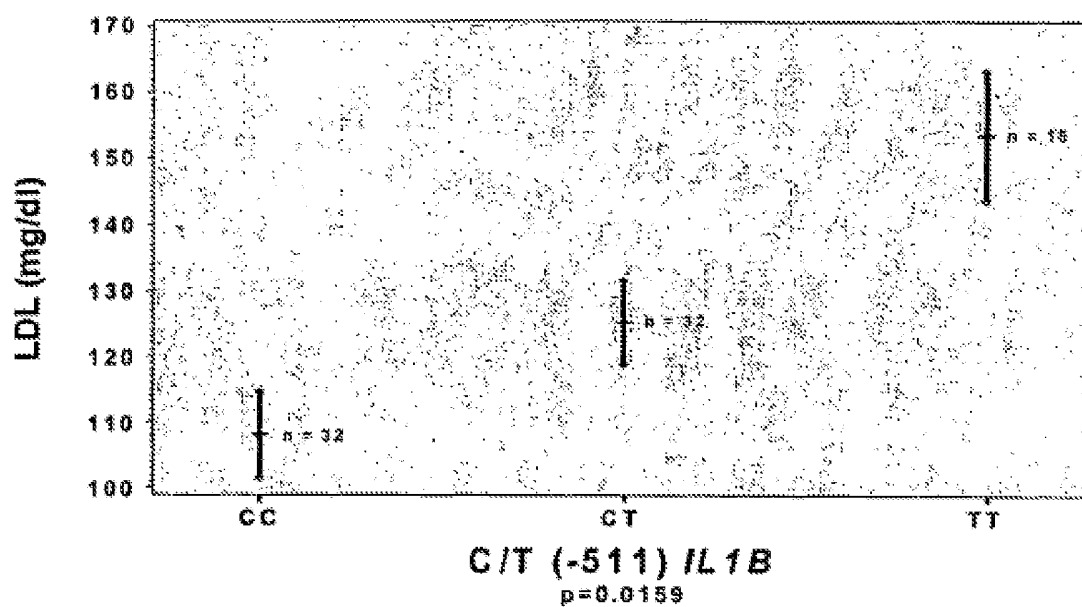
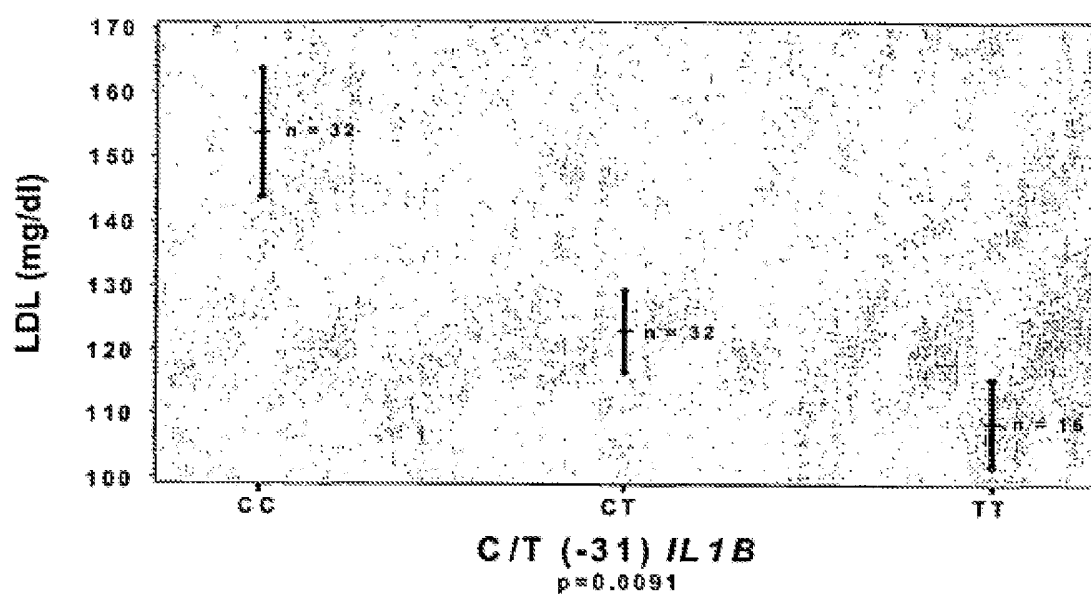


Figura 6. Média LS dos níveis de colesterol LDL, comparados os genótipos (-3) IL-1B CC, CT ou TT em todos os grupos de tratamento no ensaio clínico RAD B251



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- | | |
|-----------------|-----------------|
| * US 3929992 A | * EP 329822 A |
| * US 5258389 A | * WO 8906700 A |
| * WO 9409010 A | * WO 9511995 A |
| * WO 0160345 A | * WO 9215712 A |
| * US 6300076 B1 | * US 5679524 A |
| * US 6297018 B1 | * WO 9102087 A |
| * US 6300063 B1 | * WO 9009455 A |
| * US 5846717 A | * WO 9517676 A |
| * US 6001567 A | * US 5302509 A |
| * WO 8820020 A | * US 5945283 A |
| * WO 9820019 A | * US 5605798 A |
| * US 4965188 A | * WO 9322458 A |
| * WO 9001069 A | * WO 8910414 A |
| * US 5130238 A | * US 5866404 A |
| * US 5169766 A | * US 60415123 B |

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- | | |
|--|--|
| * SCHULER et al. <i>Transplantation</i> , 1997, vol. 64, 36-42 | * WALKER et al. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 1992, vol. 89, 392-396 |
| * RADEAU et al. <i>Nephron</i> , 2000, vol. 84, 333-341 | * WINTER et al. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 1985, vol. 82, 7575 |
| * LYAMICHEV et al. <i>Nat. Biotechnol.</i> , 1999, vol. 17, 292-296 | * MEYERS et al. <i>Science</i> , 1985, vol. 230, 1242 |
| * RYAN. <i>Mol. Diagn.</i> , 1999, vol. 4, 135-144 | * MODRICH. <i>Ann. Rev. Genet.</i> , 1991, vol. 25, 229-253 |
| * EL-OMAR et al. <i>Nature</i> , 2000, vol. 404, 398-402 | * ORITA et al. <i>Genomics</i> , 1989, vol. 5, 874-879 |
| * KUMAR et al. <i>J. Biol. Chem.</i> , 1998, vol. 273, 15742-15748 | * HUMPHRIES et al. <i>Molecular Diagnosis of Genetic Diseases</i> , 1996, 321-340 |
| * SHI. <i>Clin. Chem.</i> , 2001, vol. 47, 164-172 | * WARTELL. <i>Nucl. Acids Res.</i> , 1990, vol. 18, 2699-2706 |
| * COX et al. <i>Hum. Mutat.</i> , 2001, vol. 17, 141-150 | * SHEFFIELD et al. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 1989, vol. 86, 232-236 |
| * CHAN et al. <i>Genome Res.</i> , 1999, vol. 9, 492-499 | * RUAFIO et al. <i>Nucl. Acids Res.</i> , 1989, vol. 17, 9392 |
| * AHMADIAN et al. <i>Anal. Biochem.</i> , 2000, vol. 280, 103-110 | * RUAFIO et al. <i>Nucl. Acids Res.</i> , 1991, vol. 19, 6877-6882 |
| * RYAN et al. <i>Molecular Diagnosis</i> , 1999, vol. 4 (2), 135-144 | * TURKI et al. <i>J. Clin. Invest.</i> , 1995, vol. 95, 1635-1641 |
| * STEVENS. <i>Mol. Diag.</i> , 1999, vol. 4, 309-317 | * HARTL et al. <i>Principles of Population Genomics</i> . Sinauer Associates, 1997 |
| * BARANY et al. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 1991, vol. 88, 189-193 | * MICHALOTOS-BELOIN et al. <i>Nucl. Acids Res.</i> , 1996, vol. 24, 4841-4843 |
| * LANDEGREN et al. <i>Science</i> , 1988, vol. 241, 1077-1080 | * TOM STRACHAN ; ANDREW P. READ. <i>Human Molecular Genetics</i> . John Wiley and Sons, Inc. Publication, 1999 |