



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



**(11) PI 0914368-8 B1**

**(22) Data do Depósito:** 05/11/2009

**(45) Data de Concessão:** 22/08/2023

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA PREDIZER SE UM PACIENTE COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) ÚMIDA TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE SE BENEFICIAR PELO TRATAMENTO COM UM ANTICORPO ANTI-VEGF E MÉTODO PARA PREDIZER SE UM INDIVÍDUO TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE DESENVOLVER DMRI ÚMIDA OU DMRI SECA COM ATROFIA GEOGRÁFICA (AG)

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

**(30) Prioridade Unionista:** 01/05/2009 US 61/174,856; 05/11/2008 US 61/111,667.

**(73) Titular(es):** GENENTECH, INC.

**(72) Inventor(es):** ROBERT R. GRAHAM; HOWARD SHAPIRO; TIMOTHY W. BEHRENS; TSONTCHO IANCHULEV.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2009063434 de 05/11/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/054110 de 14/05/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 29/04/2011

**(57) Resumo:** MÉTODO E KIT PARA PREDIZER SE UM PACIENTE COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) ÚMIDA TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE SE BENEFICIAR PELO TRATAMENTO COM UM ANTICORPO ANTI-VEGF E MÉTODO PARA PREDIZER SE UM INDIVÍDUO TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE DESENVOLVER DMRI ÚMIDA OU DMRI SECA COM ATROFIA GEOGRÁFICA (AG). A presente invenção refere-se a métodos para determinar se um paciente possui risco aumentado para o desenvolvimento da DMRI úmida ou se um paciente tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF de alta afinidade.

**“MÉTODO PARA PREDIZER SE UM PACIENTE COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) ÚMIDA TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE SE BENEFICIAR PELO TRATAMENTO COM UM ANTICORPO ANTI-VEGF E MÉTODO PARA PREDIZER SE UM INDIVÍDUO TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE DESENVOLVER DMRI ÚMIDA OU DMRI SECA COM ATROFIA GEOGRÁFICA (AG)”**

**PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS**

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade, sob o título 35 § 119(e) do USC, do pedido de patente provisório dos Estados Unidos número US 61/111.667, depositado em 05 de novembro de 2011, e do pedido de patente provisório dos Estados Unidos número US 61/174.856, depositado em 01 de maio de 2009, o conteúdo dos quais são integralmente incorporados ao presente pela referência.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[002] A presente invenção está relacionada de modo geral ao tratamento de uma doença humana. Mais especificamente, a invenção está relacionada à forma úmida da degeneração macular relacionada à idade (DMRI).

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[003] A DMRI é uma das principais causas de perda irreversível e grave de visão entre os idosos. Bressler (2004) *JAMA* 291:1900-01. Ela é caracterizada por um amplo espectro de achados clínicos e patológicos, incluindo manchas amarelas pálidas conhecidas como drusas, interrupção do epitélio pigmentar da retina (EPR), neovascularização da coroide (NVC), e degeneração macular disciforme. As manifestações da doença são classificadas em duas formas: não exsudativa (seca) e exsudativa (úmida ou neovascular). Recentemente, várias terapias para o tratamento da DMRI exsudativa foram aprovadas - terapia fotodinâmica com verteporfina

(Visudyne®), um aptâmero de ligação ao VEGF, pegaptantib (Macugen®); e um fragmento de anticorpo anti-VEGF, o ranibizumab (Lucentis®).

[004] Podem ocorrer polimorfismos genéticos em uma população quando diferentes alelos em genes específicos resultam em diferentes fenótipos, incluindo o desenvolvimento ou a progressão da doença e a capacidade de resposta a drogas terapêuticas. Foram identificados vários polimorfismos que estão associados ao desenvolvimento ou progressão da DMRI (por exemplo, Despriet *et al.* (2007) *Ophthalmology* 125:1270-71; Seddon *et al.* (2007) 297:1793-99 *JAMA*, 2585; Boon *et al.* (2008) *Am. J. Genet Human.* 82:516-23). Trabalhos anteriores demonstraram que polimorfismos específicos na posição de aminoácido 402 do gene do fator H do complemento (*CFH*) estão associados a resposta à terapia foto dinâmica (TFD) com verteporfina ou terapia não aprovada (*off-label*) com bevacizumab para o tratamento da DMRI. A identificação de polimorfismos preditivos da eficácia e segurança em terapias específicas pode ser utilizada para adequar de maneira mais eficaz as terapias em pacientes que melhor se beneficiariam destas.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[005] A presente invenção é baseada em parte na identificação de polimorfismos genéticos que são preditivos do risco de DMRI ou de uma maior probabilidade de que o tratamento com anticorpos anti-VEGF de alta afinidade irão beneficiar os pacientes com DMRI.

[006] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para predizer se um paciente com DMRI úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF de alta afinidade, compreendendo a triagem para um polimorfismo genômico no alelo Y402H do gene do fator H do complemento (*CFH*) correspondente ao rs1061170 em uma amostra isolada do dito paciente, de modo que o paciente tem maior probabilidade de se beneficiar pelo dito tratamento se o genótipo

correspondente compreende CC ou CT. Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para predizer se um paciente com DMRI úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF, que compreende a triagem para um polimorfismo genômico no alelo (C5) I802V do gene do componente C5 do complemento correspondendo a rs17611 em uma amostra isolada a partir do dito paciente, em que o paciente tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo dito tratamento se o genótipo correspondente compreende AA ou AG. Em outro aspecto ainda, a presente invenção fornece um método para predizer se um paciente com DMRI úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF, compreendendo a triagem para um polimorfismo genômico no gene da serina protease 1 HrtA (*HTRA1*) alelo A69S correspondente ao rs10490924 em uma amostra isolada a partir do dito paciente, de modo que o paciente tem maior probabilidade de se beneficiar pelo dito tratamento se o genótipo correspondente compreende GT. Em alguns exemplos de realização, o método compreende ainda o tratamento do paciente com um anticorpo anti-VEGF.

[007] Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-VEGF se liga ao mesmo epítipo do anticorpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 produzido pelo hibridoma ATCC<sup>®</sup> HB 10709. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-VEGF tem um domínio variável de cadeia pesada, compreendendo as seguintes sequências de aminoácidos da região determinante de complementaridade (CDR) de cadeia pesada: CDRH1 (GYDFTHYGMN; SEQ ID NO: 1), CDRH2 (WINTYTGEPTYAADFQR; SEQ ID NO: 2) e CDRH3 (YPYYYGTSHWYFDV; SEQ ID NO: 3) e um domínio variável de cadeia leve compreendendo as seguintes sequências de aminoácidos da CDR de cadeia leve: CDRL1 (SASQDISNYLN; SEQ ID NO: 4), CDRL2 (FTSSLHS; SEQ ID NO: 5) e CDRL3 (QQYSTVPWT; SEQ ID NO: 6). Em

alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-VEGF tem o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de Y0317. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-VEGF é o ranibizumab.

[008] Em outro aspecto, a invenção fornece um kit para predizer se um paciente com DMRI úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com o ranibizumab compreendendo um primeiro oligonucleotídeo e um segundo oligonucleotídeo específicos para o polimorfismo C/T no *CFH* alelo Y402H correspondente à rs1061170. Em alguns exemplos de realização, os oligonucleotídeos podem ser usados para amplificar uma parte do gene *CFH* compreendendo um polimorfismo C/T no *CFH* alelo Y402H.

[009] Em outro aspecto, a invenção fornece um kit para predizer se um paciente com DMRI úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF, que compreende um primeiro oligonucleotídeo e um segundo oligonucleotídeo específicos para o polimorfismo A/G no alelo C5 I802V correspondendo a rs17216529. Em alguns exemplos de realização, os oligonucleotídeos podem ser usados para amplificar uma parte do gene *CFH* compreendendo um polimorfismo A/G no C5 alelo I802V.

[010] Em outro aspecto, a invenção fornece um kit para predizer se um paciente com DMRI úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF compreendendo um primeiro oligonucleotídeo e um segundo oligonucleotídeo específico para o polimorfismo G/T no *HTRA1* alelo A69S correspondente à rs10490924. Em alguns exemplos de realização, os oligonucleotídeos podem ser usados para amplificar uma parte do gene *CFH* compreendendo um polimorfismo G/T no *HTRA1* alelo A69S.

[011] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para

predizer se um indivíduo tem uma maior probabilidade de desenvolver DMRI, compreendendo a triagem para um polimorfismo genômico no alelo I145V de C5 correspondente a rs17216529 em uma amostra isolada a partir do dito paciente, onde o paciente tem maior probabilidade de desenvolver DMRI se o genótipo correspondente compreende GG ou AG.

[012] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para predizer se um indivíduo tem uma maior probabilidade de desenvolver DMRI úmida ou DMRI seca com atrofia geográfica (AG), que compreende a triagem para um polimorfismo genômico no alelo C5 I802V correspondendo a rs17661 em uma amostra isolada a partir do dito paciente, em que o paciente tem maior probabilidade de desenvolver DMRI se o genótipo correspondente compreende o alelo T (ile).

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[013] A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica, e imunologia, que estão dentro do estado da técnica. Tais técnicas são totalmente elucidadas na literatura, tal como, em "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", segunda edição (Sambrook *et al.*, 1989); "*Oligonucleotide Synthesis*" (M.J. Gait, ed., 1984); "*Animal Cell Culture*" (RI Freshney, ed., 1987); "*Methods in Enzymology*" (Academic Press, Inc.); "*Current Protocols in Molecular Biology*" (F.M. Ausubel *et al.*, Eds., 1987, e atualizações periódicas); "*PCR: The Polymerase Chain Reaction*", (Mullis *et al.*, Ed., 1994).

[014] A menos que definido de outra forma, os termos técnicos e científicos utilizados no presente relatório descritivo têm o mesmo significado que é comumente compreendido por um técnico hábil no assunto ao qual esta invenção pertence. Singleton *et al.* "*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*" 2 Ed., J. Wiley & Sons (Nova Iorque, NY, 1994), e March, "*Advanced*

*Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 4<sup>a</sup> Ed. John Wiley & Sons (Nova York, NY, 1992), fornecem para um técnico hábil no assunto um guia geral para muitos dos termos utilizados no presente pedido.

[015] Todas as referências citadas no presente, incluindo patentes e publicações, são incorporadas ao presente pela referência em sua totalidade.

### DEFINIÇÕES

[016] Conforme utilizado na presente invenção, as formas singulares “um/uma” e “o/a” incluem o plural a menos que o contexto claramente indique o contrário. Por exemplo, “uma” célula incluirá também “células”.

[017] O termo “compreende/compreendendo” destina-se a dizer que as composições e os métodos incluem os elementos recitados, porém não excluem outros.

[018] Os termos “VEGF” e “VEGF-A” são utilizados de modo indistinto na presente invenção para se referirem aos 165 aminoácidos do fator de crescimento celular endotelial e/ou aos 121-, 189-, e 206-aminoácidos relacionados com os fatores de crescimento celular endotelial, conforme descrito por Leung *et al. Science*, 246:1306 (1989), e Houck *et al. Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991), juntamente com as formas alélicas de ocorrência natural e transformadas destes. Um “anticorpo anti-VEGF” é um anticorpo que se liga a VEGF com afinidade e especificidade suficiente. Preferencialmente, o anticorpo anti-VEGF da presente invenção pode ser usado como agente terapêutico no direcionamento e interferência de doenças ou condições em que a atividade do VEGF está envolvida. Um anticorpo anti-VEGF normalmente não se liga a outros homólogos de VEGF, tal como VEGF-B ou VEGF-C, nem a outros fatores de crescimento, tais como PIGF, PDGF ou bFGF. Um anticorpo anti-VEGF preferido é um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epítopo

do anticorpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 produzido pelo hibridoma ATCC® HB 10709 e é um anticorpo anti-VEGF de alta afinidade. Um “anticorpo anti-VEGF de alta afinidade” tem pelo menos 10 vezes mais uma melhor afinidade para o VEGF do que o anticorpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1. De preferência, o anticorpo anti-VEGF é um fragmento de anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante gerado de acordo com documento WO 98/45331, incluindo um anticorpo compreendendo as CDRs ou as regiões variáveis do Y0317. Mais preferivelmente, o anticorpo anti-VEGF é o fragmento de anticorpo conhecido como ranibizumab (Lucentis®).

[019] O termo “anticorpo” é utilizado no presente no sentido mais amplo e inclui anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpos, contanto que estes exibam a atividade biológica desejada.

[020] O termo “tratamento” refere-se tanto a tratamento terapêutico quanto a medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles que necessitam de tais tratamentos incluem aqueles que já estão com a doença, bem como aqueles em que a doença deve ser evitada.

[021] O termo “polimorfismo” refere-se a uma posição na sequência de um gene que varia dentro de uma população. Um polimorfismo é composto por diferentes “alelos”. A localização de tal polimorfismo pode ser identificada pela sua posição no gene e pelos diferentes aminoácidos ou bases que são encontrados nesta posição. Por exemplo, *Y402H* do *CFH* indica que há variação entre a tirosina (Y) e histidina (H) na posição do aminoácido 402 do gene *CFH*. Esta mudança de aminoácido é o resultado de duas bases variantes possíveis, C e T, que são dois alelos diferentes. Como o genótipo é composto de dois alelos distintos, qualquer uma das diversas variantes

possíveis pode ser observada em um indivíduo (por exemplo, para este exemplo, CC, CT ou TT). Os polimorfismos individuais também são atribuídos com identificadores únicos (“Referência SNP”, “refSNP” ou “rs#”) conhecido pelos técnicos hábeis no assunto e usados, por exemplo, na base e dados de polimorfismos de nucleotídeo único “*Single Nucleotide Polymorphism Database*” (dbSNP) da “*Nucleotide Sequence Variation*” disponível na página da *web* do *NCBI*.

[022] O termo “genótipo” refere-se aos alelos específicos de um determinado gene em uma amostra de células ou tecidos. No exemplo acima, CC, CT ou TT são possíveis genótipos do polimorfismo Y402H no *CHF*.

[023] O termo “amostra” abrange uma amostra de células ou tecidos retirados de um paciente. Por exemplo, uma amostra pode incluir uma amostra de pele, uma amostra de células da bochecha, ou células sanguíneas.

[024] A identificação do genótipo em uma amostra pode ser realizada por qualquer um dentre uma série de métodos bem conhecidos por um técnico hábil no assunto. Por exemplo, a identificação do polimorfismo pode ser feita por clonagem do alelo e sequenciamento utilizando técnicas bem conhecidas no estado da técnica. Alternativamente, as sequências gênicas podem ser amplificadas a partir do DNA genômico, por exemplo, usando a PCR, e o produto sequenciado. Vários métodos não limitantes para a análise de mutações em um determinado locus genético no DNA de um paciente são descritos abaixo.

[025] A tecnologia de microarranjos de DNA, por exemplo, dispositivos de *chip* de DNA e microarranjos de alta densidade para aplicações de seleção de alto rendimento e microarranjos de baixa densidade, podem ser utilizados. Os métodos para a fabricação de microarranjo são conhecidos no estado da técnica e incluem diversas tecnologias e processos de marcação (*spotting*) ou de deposição de microjato e jato de tinta, processos de síntese de

oligonucleotídeos fotolitográfico *in situ* ou sobre chip e processos eletrônicos de endereçamento da sonda de DNA. As aplicações de hibridização em microarranjo de DNA têm sido utilizadas com sucesso nas áreas de análise da expressão gênica e genotipagem de mutações pontuais, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), e repetições curtas em tandem (*short tandem repeats* - STRs). Métodos adicionais incluem microarranjos de RNA de interferência e combinações de microarranjos e outros métodos, como a microdissecção e captura a laser (LCM), hibridização genômica comparativa (CGH) e imunoprecipitação da cromatina (ChiP). Vide, por exemplo, He *et al.* (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593:117-133 e Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:129-153. Outros métodos incluem a PCR, xMAP, ensaio invasor, espectrometria de massa, e pirosequenciamento (Wang *et al.* (2007). *Microarray Technology and Cancer Gene Profiling* Vol. 593 da série de livros "Advances in Experimental Medicine and Biology", pub. Springer, Nova Iorque).

[026] Outro método de detecção é a hibridização alelo específica usando sondas que sobrepõem o sítio polimórfico e possuem cerca de 5 ou, alternativamente 10, ou alternativamente, 20, ou alternativamente 25, ou alternativamente 30 nucleotídeos em toda a região polimórfica. Por exemplo, várias sondas capazes de hibridizar especificamente a variante alélica são ligadas a um suporte da fase sólida, por exemplo, um "chip". Os oligonucleotídeos podem se ligar a um suporte sólido por uma variedade de processos, incluindo a litografia. A análise de detecção da mutação utilizando esses chips compreendendo oligonucleotídeos, também chamadas de "matrizes de sonda de DNA" é descrita, por exemplo, em Cronin *et al.* (1996) *Human Mutation* 7:244.

[027] Em outros métodos de detecção, é primeiro necessário a amplificação de pelo menos uma porção do gene antes da identificação da variante alélica. A amplificação pode ser feita, por exemplo, por PCR e/ou LCR

ou por outros métodos conhecidos no estado da técnica.

[028] Em alguns casos, a presença do alelo específico no DNA de um indivíduo pode ser demonstrada pela análise com enzimas de restrição. Por exemplo, o polimorfismo do nucleotídeo específico pode resultar em uma sequência de nucleotídeos compreendendo um sítio de restrição que está ausente da sequência de nucleotídeos de outra variante alélica.

[029] Em um exemplo de realização adicional, a proteção contra agentes de clivagem (tal como uma nuclease, hidroxilamina ou tetróxido de ósmio e com piperidina) pode ser usada para detectar bases não pareadas em RNA/RNA, DNA/DNA, ou heteroduplexos RNA/DNA (vide, por exemplo, Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). Em geral, a técnica de “clivagem de bases não pareadas” (*mismatch cleavage*) se inicia com o fornecimento de heteroduplexos formados pela hibridização de um ácido nucleico controle, que é opcionalmente marcado, por exemplo, RNA ou DNA, compreendendo uma sequência nucleotídica da variante alélica do gene com uma amostra de ácido nucleico, por exemplo, RNA ou DNA obtido a partir de uma amostra de tecido. Os dúplices de fita dupla são tratados com um agente que cliva as regiões de fita simples (única) do dúplice, tal como dúplices formados com base no não pareamento dos pares de base entre as fita controle e a fita da amostra. Por exemplo, dúplices de RNA/DNA podem ser tratados com RNase e híbridos DNA/DNA tratados com nuclease S1 para digerir enzimaticamente as regiões não pareadas. Alternativamente, tanto os dúplices DNA/DNA como dúplices RNA/DNA podem ser tratados com hidroxilamina ou tetróxido de ósmio com piperidina, a fim de digerir as regiões não pareadas. Após a digestão das regiões incompatíveis, o material resultante é então separado por tamanho em géis de poliacrilamida para determinar se os ácidos nucleicos da amostra e do controle possuem uma sequência de nucleotídeos idêntica ou se os nucleotídeos destas amostras são diferentes. Vide, por exemplo, a Patente US

6.455.249, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295.

[030] As alterações na mobilidade eletroforética também podem ser usadas para identificar a variante alélica. Por exemplo, um polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) pode ser usado para detectar diferenças na mobilidade eletroforética entre ácidos nucleicos mutantes e do tipo selvagem (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766; Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 e Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Os fragmentos de DNA de fita simples de ácidos nucleicos de amostras e controle são desnaturados e renaturados. A estrutura secundária dos ácidos nucleicos de fita simples varia de acordo com a sequência, a alteração resultante na mobilidade eletroforética permite a detecção da alteração de até mesmo uma única base. Os fragmentos de DNA podem ser marcados ou detectados com sondas marcadas. A sensibilidade do ensaio pode ser melhorada pelo uso de RNA (ao invés de DNA), em que a estrutura secundária é mais sensível a uma alteração na sequência. Em outro exemplo de realização preferido, o método em questão utiliza a análise do heteroduplexo para separar moléculas heteroduplexas de fita dupla com base nas alterações na mobilidade eletroforética (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet.* 7:5).

[031] A identidade da variante alélica pode também ser obtida por meio da análise da mobilidade de um ácido nucleico compreendendo a região polimórfica no gel de poliacrilamida contendo um gradiente de desnaturante, que é analisada usando a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). Quando a DGGE é utilizada como método de análise, o DNA será modificado para garantir que ele não desnature por completo, por exemplo, pela adição por PCR de um “grampo GC” (*GC-clamp*) de cerca de 40 pb de DNA rico em guanina e citosina com alto ponto de fusão. Em um exemplo de realização adicional, um gradiente de

temperatura é usado no lugar de um gradiente desnaturante para identificar as diferenças na mobilidade entre o controle e a amostra de DNA (Rosenbaum e Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:1275).

[032] Exemplos de técnicas para detectar diferenças de pelo menos um nucleotídeo entre os dois ácidos nucleicos incluem, mas não são limitados a, hibridização seletiva do oligonucleotídeo, amplificação seletiva, ou extensão seletiva do *primer*. Por exemplo, as sondas de oligonucleotídeos podem ser preparadas de modo que o nucleotídeo polimórfico conhecido é colocado centralmente (sondas alelo-específicas) e hibridizado com o DNA alvo em condições que permitam que a hibridização ocorra somente se um pareamento perfeito é encontrado (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230). Tais técnicas de hibridização de oligonucleotídeos alelo- específicas podem ser usadas para a detecção de alterações nucleotídicas na região polimórfica do gene. Por exemplo, os oligonucleotídeos possuindo a sequência nucleotídica da variante alelo-específica estão ligados a uma membrana hibridizante e esta membrana é então hibridizada com a amostra de ácido nucleico marcada. Análise do sinal de hibridização revelará então a identidade dos nucleotídeos da amostra de ácido nucleico.

[033] Alternativamente, a tecnologia de amplificação alelo-específica que depende da amplificação seletiva pode ser usada em conjunto com a presente invenção. Os oligonucleotídeos utilizados como *primers* para a amplificação específica pode levar a variante alélica de interesse no centro da molécula (para que a amplificação dependa da hibridização diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) *Acids Nucl. Res.* 17:2437-2448) ou na extremidade 3' de um *primer* onde, sob condições adequadas, o não pareamento pode impedir ou reduzir a extensão da polimerase (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238 e Newton *et al.* (1989) *Acids Nucl. Res.* 17:2503). Essa técnica também é chamada de

“PROBE” para Extensão da Sonda Oligo Base. Além disso, pode ser desejável a introdução de um novo sítio de restrição na região da mutação para criar sistemas de detecção baseados na clivagem (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell. Probes* 6:1).

[034] Em outro exemplo de realização, a identificação da variante alélica foi realizada utilizando um ensaio de ligação de oligonucleotídeo (OLA), conforme descrito, por exemplo, na Patente US 4.998.617 e em Laridegren, U. *et al. Science* 241:1077-1080 (1988). O protocolo OLA usa dois oligonucleotídeos que são projetados para serem capazes de se hibridizar com as sequências adjacentes de um alvo de fita única. Um dos oligonucleotídeos está ligado a um marcador de separação, por exemplo, biotina, e o outro é marcado para a detecção. Se a sequência complementar precisa é encontrada em uma molécula-alvo, os oligonucleotídeos irão hibridizar suas extremidades terminais, e criar um substrato de ligação. A ligação então permite que o oligonucleotídeo marcado seja recuperado usando avidina, ou outro ligante da biotina. Nickerson, D. A. *et al.* descreveram um teste de detecção de ácido nucleico que combina os atributos da PCR e da OLA (Nickerson, D.A. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-8927). Neste método, a PCR é usada para a obtenção da amplificação exponencial do DNA alvo, que é então detectada usando o método OLA.

[035] A invenção fornece métodos para a detecção de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no *CFH* e *C5*. Pelo fato dos polimorfismos de nucleotídeo único serem flanqueados por regiões da sequência não variável, a sua análise não exige mais do que a determinação da identidade do nucleotídeo variante único e não é necessário determinar a sequência genética completa de cada paciente. Vários métodos foram desenvolvidos para facilitar a análise de SNPs.

[036] O polimorfismo de base única pode ser detectado usando

um nucleotídeo resistente à exonuclease especializada, conforme divulgado, por exemplo, na Patente US 4.656.127. De acordo com o método, um *primer* complementar a sequência alélica imediatamente a 3' do sítio polimórfico é permitido hibridizar a uma molécula-alvo obtida a partir de um determinado animal ou humano. Se o sítio polimórfico da molécula de destino contém um nucleotídeo que é complementar ao nucleotídeo resistente à exonuclease específica derivado da presente invenção, então esse derivado será incorporado na extremidade do *primer* hibridizado. Essa incorporação torna o *primer* resistente a exonuclease, e assim permite a sua detecção. Como a identidade do derivado resistente à exonuclease da amostra é conhecida, a conclusão de que o *primer* se tornou resistente à exonuclease revela que o atual nucleotídeo no sítio polimórfico da molécula-alvo era complementar ao do nucleotídeo derivado usado na reação. Este método tem a vantagem de não requer a determinação de grandes quantidades de dados de sequências estranhas.

[037] Um método baseado em solução também pode ser usado para determinar a identidade dos nucleotídeos do sítio polimórfico (documento WO 91/02087). Como dito acima, é empregado um *primer* que é complementar às sequências alélicas imediatamente 3' a um sítio polimórfico. O método permite determinar a identidade dos nucleotídeos do sítio usando derivados de dideoxynucleotídeos marcados, que, se complementares ao nucleotídeo do sítio polimórfico serão incorporados à extremidade do *primer*.

[038] Um método alternativo é descrito no documento WO 92/15712. Este método utiliza misturas de terminadores marcados e um *primer* que é complementar à sequência de 3' de um sítio polimórfico. O terminador marcado que é incorporado é, assim, determinado por, e complementar, ao nucleotídeo da presente invenção no sítio polimórfico da molécula-alvo sendo avaliada. O método é geralmente um ensaio de fase heterogênea, em que o

*primer* ou a molécula-alvo é imobilizado em uma fase sólida.

[039] Muitos outros procedimentos de incorporação de nucleotídeos guiados por *primer* para a avaliação de sítios polimórficos no DNA foram descritos (Komher, J. S. *et al.* (1989) *Nucl. Acids. Res.* 17:7779-7784; Sokolov, B. P. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:3671; Syvanen, A.-C., *et al.* (1990) *Genomics* 8:684-692; Kuppaswamy, M. N. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147; Prezant, T. R. *et al.* (1992) *Hum. Mutat.* 1: 159-164; Ugozzoli, L. *et al.* (1992) *GATA* 9:107-112; Nyren, P. *et al.* (1993) *Anal. Biochem.* 208:171-175). Todos estes métodos dependem da incorporação do deoxinucleotídeos marcado para discriminar entre as bases de um sítio polimórfico.

[040] Além disso, será entendido que qualquer um dos métodos acima para detectar alterações em um gene ou produto gênico ou variantes polimórficas podem ser usadas para monitorar o curso do tratamento ou terapia.

[041] Os métodos descritos no presente documento podem ser realizados, por exemplo, por meio da utilização de kits diagnósticos pré-embalados, tais como os descritos abaixo, incluindo pelo menos uma sonda ou *primer* de ácido nucleico, que pode ser convenientemente utilizado, por exemplo, para determinar se um indivíduo tem um aumento da probabilidade de desenvolver DMRI ou se um paciente com DMRI exsudativa (tipo úmida) tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF.

[042] A amostra de ácido nucleico para o uso nos métodos diagnósticos e prognósticos descritos acima pode ser obtida a partir de qualquer tipo de célula ou tecido de um sujeito. Por exemplo, um fluido corporal do indivíduo (por exemplo, sangue) pode ser obtido por meio de técnicas conhecidas. Alternativamente, os testes de ácido nucleico podem ser

realizados em amostras secas (por exemplo, cabelos ou pele).

[043] A invenção descrita no presente refere-se a métodos e composições para a determinação e identificação dos alelos presentes em vários alelos, incluindo os alelos *Y402H* no *CFH*, *I145V* no *C5*, e *I802V* no *C5*. Sondas podem ser usadas para determinar diretamente o genótipo da amostra ou podem ser utilizadas simultaneamente ou após a amplificação. A expressão “sondas” inclui ácidos nucleicos de ocorrência natural ou recombinantes de fita simples (única) ou de fita dupla ou ácidos nucleicos quimicamente sintetizados. Eles podem ser marcados por tradução por cortes “*nick translation*”, reação preenchida de *Klenow*, PCR ou outros métodos conhecidos no estado da técnica. As sondas da presente invenção, sua preparação e/ou marcação, são descritas em Sambrook *et al.* (1989) *supra*. Uma sonda pode ser um polinucleotídeo de qualquer comprimento adequado para hibridização seletiva a um ácido nucleico que contém uma região polimórfica da invenção. O comprimento da sonda utilizada vai depender, em parte, da natureza do ensaio utilizado e das condições de hibridização empregadas.

[044] As sondas marcadas também podem ser usadas em conjunto com a amplificação de um polimorfismo. (Holland *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7280). A Patente US 5.210.015 descreve abordagens baseadas em fluorescência para fornecer medições em tempo real dos produtos de amplificação durante a PCR. Essas abordagens foram empregadas tanto pela intercalação de corantes (como o brometo de etídio) para indicar a quantidade de DNA dupla fita presente, como pela utilização de sondas contendo pares de supressores de fluorescência (também conhecido como abordagem “*TaqMan*®”) onde a sonda é clivada durante a amplificação para liberar uma molécula fluorescente cuja concentração é proporcional à quantidade de DNA dupla-fita presente. Durante a amplificação, a sonda é digerida pela atividade nuclease de uma polimerase quando hibridizada com a

sequência alvo para causar a separação da molécula fluorescente da molécula supressora de fluorescência (*quencher*), provocando o aparecimento da fluorescência da molécula repórter. A abordagem TaqMan<sup>®</sup> utiliza uma sonda que contém um par molécula-repórter molécula-supressora de fluorescência (*quencher*) que anela especificamente à uma região de um polinucleotídeo alvo contendo o polimorfismo.

[045] As sondas podem ser coladas em superfícies para o uso como "*chips* de gene". Tais chips de genes podem ser usados para detectar variações genéticas por uma diversidade de técnicas conhecidas pelos técnicos hábeis no assunto. Em uma técnica, os oligonucleotídeos estão dispostos em um *chip* de gene para determinar a sequência de DNA pelo sequenciamento de uma abordagem de hibridação, tal como aquela mencionada nas Patentes US 6.025.136 e US 6.018.041. As sondas da presente invenção também podem ser usadas para a detecção fluorescente de uma sequência genética. Tais técnicas foram descritas, por exemplo, nas Patentes US 5.968.740 e US 5.858.659. A sonda também pode ser afixada a uma superfície de eletrodo para a detecção eletroquímica de sequências de ácido nucleico, conforme descrito na Patente US 5.952.172 e por Kelley, S. O. *et al.* (1999) *Nucl. Acids Res.* 27:4830-4837.

[046] Além disso, os ácidos nucleicos isolados utilizados como sondas ou *primers* podem ser modificados para se tornarem mais estáveis. Moléculas de ácido nucleico exemplares que são modificadas incluem análogos fosforamidato, fosfotioato e metilfosfonato do DNA (vide também as Patentes US 5.176.996; US 5.264.564 e US 5.256.775).

[047] Conforme estabelecido no presente, a invenção também fornece métodos diagnósticos para determinar o tipo de variantes alélicas das regiões polimórficas presentes no *CFH* ou *C5*. Em alguns exemplos de realização, os métodos utilizam sondas ou *primers* compreendendo sequências

nucleotídicas que são complementares a uma região polimórfica do *CFH* ou *C5*. Assim, a invenção fornece *kits* para a realização destes métodos.

[048] Em alguns exemplos de realização, a invenção fornece um kit para determinar se um paciente com DMRI tipo úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com um anticorpo anti-VEGF, incluindo um anticorpo de anti-VEGF de alta afinidade. Esses kits contêm uma ou mais das composições e instruções de uso descritas a seguir. Apenas como um exemplo, a invenção fornece um kit para prever se um paciente com DMRI tipo úmida tem uma maior probabilidade de se beneficiar pelo tratamento com o ranibizumab compreendendo um primeiro oligonucleotídeo e um segundo oligonucleotídeo específico para o polimorfismo C/T no alelo *Y402H* do *CFH*. Os oligonucleotídeos “específicos para” um locus genético se ligam tanto a região polimórfica do locus como a região adjacente à região polimórfica do locus. Para oligonucleotídeos a são usados como *primers* para a amplificação, os *primers* são adjacentes se estiverem suficientemente próximos para serem usados para produzir um polinucleotídeo compreendendo a região polimórfica. Em um exemplo de realização, os oligonucleotídeos são adjacentes se eles se ligam dentro de cerca de 1-2 kb, por exemplo, menos de 1 kb do polimorfismo. Os oligonucleotídeos específicos são capazes de hibridizar uma sequência, e, sob condições adequadas, não se ligam a uma sequência que diferem por um único nucleotídeo.

[049] O kit pode compreender pelo menos uma sonda ou *primer* que é capaz de hibridizar especificamente à região polimórfica do *CFH* ou *C5* e instruções para o uso. Os kits incluem normalmente pelo menos um dos ácidos nucleicos descrito acima. Os kits para a amplificação de pelo menos uma porção do *CFH* ou *C5* compreendem geralmente de pelo menos dois *primers*, um dos quais é capaz de hibridizar com a sequência variante alélica. Esses kits são apropriados para a detecção do genótipo, por exemplo, detecção de fluorescência, detecção

eletroquímica, ou por outros tipos de detecção.

[050] Os oligonucleotídeos, quando utilizados como sondas ou *primers*, contidos em um kit podem ser marcados para a detecção. Os marcadores podem ser detectados diretamente, por exemplo, marcadores fluorescentes, ou indiretamente. A detecção indireta pode incluir qualquer método de detecção conhecido pelos técnicos hábeis o assunto, incluindo interações avidina-biotina, ligação de anticorpo e similares. Os oligonucleotídeos marcados com fluorescência também pode conter uma molécula de supressão da fluorescência (*quenching*). Os oligonucleotídeos podem estar ligados a uma superfície. Em alguns exemplos de realização, a superfície é sílica ou vidro. Em alguns exemplos de realização, a superfície é um eletrodo de metal.

[051] Entretanto, outros kits da invenção compreendem pelo menos um reagente necessário para a realização do ensaio. Por exemplo, o kit pode compreender uma enzima. Alternativamente, o kit pode compreender um tampão ou qualquer outro reagente necessário.

[052] Os kits podem incluir todos ou alguns dos controles positivos, controles negativos, reagentes, *primers*, marcadores de sequenciamento, sondas e anticorpos descritos no presente para determinar o genótipo do indivíduo na região polimórfica do *CFH* ou *C5*.

[053] O exemplo a seguir é destinado apenas para ilustrar a prática da presente invenção e não é fornecido com o objetivo de limitar a invenção.

#### EXEMPLO

#### EXEMPLO 1

### POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO *CFH*, *HTRA1* E *C5* E A ASSOCIAÇÃO DESTES COM A

### OCORRÊNCIA DA DMRI E RESULTADOS DO TRATAMENTO

#### POLIMORFISMOS

[054] Nós testamos uma variedade de polimorfismos para a variação associada com uma evolução favorável durante a terapia com anti-

VEGF usando o ranibizumab. Foram examinados estes polimorfismos que foram escolhidos porque são oito alelos de 5 locus previamente relatados por estarem associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento da DMRI (Tabela 1). Especificamente, dois alelos do fator H (*CFH*), HTRA serina peptidase/suscetibilidade de maculopatia relacionada à idade 2 (*HTRA1/ARMS2*), Fator do Complemento 2/pré-proteína do Fator B do Complemento (*C2/BF*), e um único alelo do Fator 3 do Complemento (*C3*) e quimiocinas (motivo C-X3-C) receptor 1 (*CX3CR1*) foram genotipados em 352 amostras de DMRI a partir do estudo *DAWN* usando PCR quantitativo, através do sistema TaqMan®. Além disso, testamos dois alelos do componente 5 do complemento (*C5*) (Tabela 2). O protocolo experimental padrão fornecido pela ABI foi utilizado para a genotipagem de todos os ensaios na Tabela 1. Resumidamente, os ensaios foram executados em uma máquina ABI 7500, utilizando as seguintes condições de ciclagem: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 92 °C e 1 min a 60 °C.

**TABELA 1****POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) TESTADOS**

<b>Locus</b>	<b>SNP</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Posição Cromossômica*</b>	<b>Informação do alelo de sentido incorreto</b>	<b>Referência</b>
<b>CFH</b>	rs1061170	1	193,390,894	Y402H	Maller et al. (2006) Nature Genet. 38:1055-59
<b>CFH</b>	rs1410996	1	193,428,590	--	Maller et al. supra
<b>HTRA1</b>	rs11200638	10	124,210,534	--	Dewan et al. (2006) Science 314:989-92; Yang et al. (2006) Science 314:992-93
<b>HTRA1</b>	rs10490924	10	124,204,438	A69S	Kanda et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:16227-32
<b>C3</b>	rs2230199	19	6,669,387	--	Yates et al. (2007) NEJM 357:553
<b>C2/BF</b>	rs547154	6	32,018,917	C2 intron (LD com	Gold et al. (2006) Nature Genet.

Locus	SNP	Cromossomo	Posição Cromossômica*	Informação do alelo de sentido incorreto	Referência
				L9H no BF)	38:458-62
<b>C2/BF</b>	rs9332739	6	32,011,783	E318D (C2)	Gold et al. supra
<b>CX3CR1</b>	rs3732378	3	39,282,166	M280T	Chan et al. (2005) Histol. Histopath. 20:857-63

\* Posição em pares de bases a partir da montagem do genoma humano de Maio de 2004.

## TABELA 2

### POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) TESTADOS PARA C5

Locus	SNP	Cromossomo	Posição Cromossômica*	Informação do alelo de sentido incorreto	Referência
<b>C5</b>	rs17216529	9	120,879,772	I145V	
<b>C5</b>	rs17611	9	120,848,754	I802V	

\* Posição em pares de bases a partir da montagem do genoma humano de Maio de 2004.

## AMOSTRAS

[055] Amostras de sangue periférico de 352 indivíduos anônimos provenientes dos principais estudos da Lucentis® (MARINA, ANCHOR e FOCUS) que participaram do sub estudo genético DAWN, uma extensão do estudo HORIZONTE, foram coletados e o DNA genômico foi isolado. Todas as amostras tiveram o diagnóstico de DMRI neovascular confirmada, 60% eram do sexo feminino, e a média de idade no início do estudo foi de 75,0 anos de idade para *sham*(placebo)/PDT e 75,6 anos de idade para os tratados com ranibizumab. O consentimento informado escrito foi obtido de todos os indivíduos do estudo e os protocolos de estudo foram aprovados pelos conselhos de revisão institucional (comitê de ética em pesquisa). O DNA foi extraído utilizando o kit “Dneasy® Tissue kit” Qiagen, Valencia, CA). Os SNPs foram genotipados com TaqMan® com base na PCR em Tempo Real. Para dois foram utilizados *primers* personalizado para SNPs (Tabela 4) e para os outros foram usados seis *primers* de propriedade da ABI (Tabela 3). Os dois SNPs C5 (oligonucleotídeos apresentados na Tabela 5) foram tipados como parte de um painel de ensaio SNP 96 personalizado usando a plataforma

Illumina® GoldenGate.

**TABELA 3**

**ENSAIOS USADOS PARA O GENÓTIPO DE SNPs**

SNP Ref. Seq. ID	Símbolo do Gene	Ensaio ABI ID*
rs1061170	CFH	<i>Personalizado</i>
rs1410996	CFH	C__2530294_10
rs11200638	HTRA1; ARMS2	<i>Personalizado</i>
rs10490924	HTRA1; ARMS2	C__29934973_20
rs2230199	C3	C__26330755_10
rs547154	RDBP; CFB; C2	C__940286_10
rs9332739	CFB; C2	C__29531804_10
rs3732378	CX3CR1	C_____5687_1_

\* Os ensaios de genotipagem de SNP TaqMan® pré-concebidos (Applied Biosystems, Foster City, CA ) estavam disponíveis para seis dos alelos. A identificação do ensaio ABI (Ensaio ABI ID) é mostrada para os ensaios pré-concebidos, uma vez que as sequências de *primers* são de propriedade desta. Os ensaios com TaqMan® personalizados foram projetados para os dois alelos restantes, e os *primers* estão na Tabela 4.

**TABELA 4**

**PRIMERS USADOS PARA A GENOTIPAGEM DE RS1061170 E RS11200638**

SNP ID	rs1061170	rs11200638
<i>Primer</i> direto ( <i>forward</i> )	CTTTATTTATTTATCATTGTTATGGTCCTTAGGAAAATG TTATT (SEQ ID NO: 7)	GGCGCGGGCTTTC TG (SEQ ID NO: 11)
<i>Primer</i> reverso ( <i>reverse</i> )	GGCAGGCAACGTCTATAGATTTACC (SEQ ID NO: 8)	CGCGGGACCCTGA CC (SEQ ID NO: 12)
Reporter1_VI C	TTCTTCATAATTTTG (SEQ ID NO: 9)	CTTCGTCCAGCCG CA (SEQ ID NO: 13)
Reporter2_FA M	TTCTTCATAATTTTG (SEQ ID NO: 10)	TTCGTCCGGCCGC A (SEQ ID NO: 14)

**TABELA 5**

**PRIMERS USADOS PARA A GENOTIPAGEM DE SNPs C5 RS17216529 E RS17611**

SNP ID	rs17216529	rs17611
--------	------------	---------

SNP ID	rs17216529	rs17611
Primer	ATATCCTTGTTTTAGCAGAGTTTT TGATTATATCAATTATTCTTACAGT AAAAGTTAGA[A/G]TTTATTTCGTTG AATGACGACTTGAAGCCAGCCAAA AGAGAAACTGTCTTAACTTTTCATAG (SEQ ID NO: 15)	TCCAGAAAACAGTTGCAGTTTGCC CTACCTGATTCTCTAACCACCTGG GAAATTCAAGGC[A/G]TTGGCATT CAAACACTGGTAAGCAGGTTTAAG TGATATATGCATTTAAATAGTGATT TG (SEQ ID NO: 16)

### **INFORMAÇÃO CLÍNICA**

[056] As informações clínicas a partir dos estudos da Lucentis MARINA, ANCHOR e FOCUS foram examinadas. Especificamente, as informações relacionadas quanto à raça autoidentificada, sexo, idade no início do estudo, grupo de tratamento inicial do estudo, Dose de Lucentis, *crossover* do braço de tratamento no ano 2, Presença de erro de dosagem, Estudo da pontuação da melhor Acuidade visual corrigida (VA) basal (BL) em letras, pontuação do olho contralateral pela VA em BL (letras), Estudo da pontuação VA no olho no 12º mês (letras), pontuação do olho contralateral pela VA no 12º mês (letras), presença de DMI neovascular no olho contralateral no tempo BL, e classificação NVC.

### **ASSOCIAÇÃO PARA ANÁLISE DE SENSIBILIDADE**

[057] Os oito alelos foram examinados para uma associação com a susceptibilidade da doença, comparando a frequência do alelo nos casos do estudo DAWN com amostras controles obtidas de fontes disponíveis publicamente. Para rs10490924, rs1410996, rs9332739 e rs3732378, informações sobre a frequência do alelo controle foi obtida a partir de resumos estatísticos disponíveis gratuitamente a partir do “*Wellcome Trust Case Control Consortium*” (WTCCC (2007) *Nature* 447:661-78). O controle de frequências alélicas e contagem de genótipos dos SNPs restantes foram retirados de um documento relatando a associação de rs11200638 3, rs2230199 6 e rs547154 1. As associações estatísticas foram calculadas utilizando tabelas de resultados padrões 2x2.

### **ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO PARA CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASAIS**

[058] A associação dos alelos 8 para a acuidade visual basal (VA) foi realizada utilizando VA (letras) no olho em estudo no início do estudo como uma característica quantitativa, com ou sem a idade inicial adicionada como covariável. As três classes genóticas foram testadas pelas diferenças significativas na mediana da VA basal. A análise foi realizada utilizando o software *PLINK* (Purcell *et al.* (2007). *Am. J. Hum. Genet.* 81:559-75). A associação dos oito alelos com a presença de DMRI neovascular no olho contralateral, e classificação da doença neovascular (minimamente clássica, predominantemente clássica e oculta sem clássica) do olho em estudo no tempo basal foi avaliada. A frequência do quadro clínico foi estratificada por genótipo e a significância determinada pelo teste *t*.

### **ENRIQUECIMENTO DE ALELOS DE RISCO PARA DMRI NO ESTUDO DAWN**

[059] Confirmando as observações publicadas anteriormente, os alelos de todos os oito locus estavam associados ao risco de DMRI neovascular com  $P < 0,05$ . No entanto, apenas o alelo do locus CX3CR1 não apresentou associação consistente com o relatório original. Nas amostras do estudo DAWN o locus CX3CR1 tiveram um risco relacional (*odds ratio*) de 1,12, em contraste com um *odds ratio*  $> 3$  no relatório original. Uma associação significativa foi observada entre o rs17216529 (I145V no C5) e a ocorrência da neovascularização de coroide (NVC) nos olhos contralaterais de indivíduos com a DMRI (Tabela 6). Além disso, foi observada uma associação entre o rs17611 (I802V no C5) e a ocorrência de DMRI exsudativa (tipo úmida), tipo seca com DMRI AG, ou ambas (Tabela 7). Esta associação foi mais forte nos casos de DMRI ( $p = 0,0014$ ) do que nos casos de DMRI tipo seca com AG.

**TABELA 6**

### **ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO NA RS17216529 (I145V NO C5) COM NVC.**

	C5 I145V		
	AA	AG	GG

	<b>C5 I145V</b>		
	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>
Percentual de patentes com NVC no olho contralateral no tempo basal	38,7	44,3	54,8
N de pessoas	93	140	62

**TABELA 7**

**ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO NA RS17611 (I802V NO GENE C5) COM DMRI TIPO ÚMIDA, DMRI TIPO SECA COM AG E TANTO DMRI TIPO ÚMIDA COMO DMRI TIPO SECA COM AG, OU AMBAS**

Tipo de DMRI	Alelo I802V	Número de amostras		Frequência alélica		Risco Relacional	Valor de p
		Caso	Controle	Caso	Controle		
Úmida	T (ile)	1136	8236	0,420	0,454	0,87	0,0021
Seca com AG	T (ile)	400	8236	0,448	0,454	0,97	0,7168
Úmida e/ou seca com AG	T (ile)	1536	8236	0,423	0,455	0,88	0,0014

**ASSOCIAÇÃO DE ALELOS PARA CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASAIS**

[060] Nenhuma associação significativa dos 8 alelos na acuidade visual basal foi observada. O número de alelos de risco do alelo Y402H no *CFH* e do alelo A69S no *HTRA1* foram associados com a prevalência de DMRI neovascular no olho contralateral nas amostras, sugerindo uma ligação entre o genótipo nestes locos e gravidade da doença. O alelo Y402H do *CFH* foi associado com o subtipo “predominantemente clássico” de DMRI neovascular no olho de estudo no início do estudo. O alelo rs1410996 intrônico de *CFH* foi associado com a área da lesão na NVC e NVC clássica e o alelo I802V do *C5* foi associado com a área da lesão na NVC clássica.

**ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO COM A RESPOSTA À TERAPIA DE RANIBIZUMAB**

[061] As amostras do estudo DAWN foram separadas em 3 grupos com base no estado de tratamento durante os estudos MARINA ANCHOR e FOCUS. O grupo tratado com ranibizumab incluiu indivíduos que receberam doses de 0,3 mg, 0,5 mg ou 0,5 mg + PDT. O grupo Sham/PDT consistiu de indivíduos que receberam uma injeção simulada (SHAM) ou apenas a terapia fotodinâmica (PDT). A associação da alteração na acuidade visual (AV, medida em letras) após 12 meses de tratamento foi avaliada para uma associação com o genótipo de cada um dos oito alelos. Diferenças significativas na resposta ao tratamento foram associadas com o genótipo nos alelos Y402H do gene *CFH*, I802V do gene *C5*, e A69S do gene *HTRA1* (Tabelas 8, 9 e 10). Estas variações estão associadas com mudanças na VA em pacientes tratados mensalmente com ranibizumab. Variação média da AV em 12 meses foi de +14,5, +10,8 e +7,0 letras para os genótipos Y402H CC, CT e TT, respectivamente, +15,6, +12,2 e +8,8 letras para os genótipos I802V AA, AG e GG, respectivamente; e +9,3, +14,1 e +10,5 para os genótipos A69S GG, GT e TT, respectivamente. Para os alelos Y402H do *CFH*, uma tendência inversa correspondente foi observada no grupo controle (SHAM/PDT), com variação média na acuidade visual aos 12 meses de -4,8, -10,2 e -11,5 para os genótipos Y402H CC, CT e TT, respectivamente. A diferença na média dos resultados da BCVA de 12 meses entre os grupos controle e de tratamento com ranibizumab foi o mesmo em todos os genótipos de risco Y402H.

**TABELA 8**

**ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO NO Y402H *CFH* COM A RESPOSTA À TERAPIA DE RANIBIZUMAB**

		Y402H <i>CFH</i>		
		CC	CT	TT
SHAM ou PDT	Variação média da VA	-4,8	-10,2	-11,5

		Y402H CFH		
		CC	CT	TT
	N de pessoas	30	36	10
Tratado com Ranibizumab (0,3 mg + 0,5 mg)	Varição média da VA	14,5	10,8	7,0
	N de pessoas	58	93	23

**TABELA 9****ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO NO C5 I802V COM A RESPOSTA À TERAPIA DE****RANIBIZUMAB**

		I802V C5		
		AA	AG	GG
SHAM ou PDT	Varição média da VA	-11,6	-9,4	-4,8
	N de pessoas	16	50	44
Tratado com Ranibizumab (0,3 mg + 0,5 mg)	Varição média da VA	15,1	10,6	9,1
	N de pessoas	36	125	80

**TABELA 10****ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO NO A69S DO GENE HTRA1 COM RESPOSTA À TERAPIA****DE RANIBIZUMAB**

		I802V C5		
		GG	GT	TT

		<b>I802V C5</b>		
		<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>
SHAM ou PDT	Varição média da VA	-8,0	-9,0	-4,4
	N de pessoas	24	60	14
Tratado com Ranibizumab (0,3 mg + 0,5 mg)	Varição média da VA	9,3	14,1	10,5
	N de pessoas	68	80	49

### **REIVINDICAÇÕES**

1. MÉTODO PARA PREDIZER SE UM PACIENTE COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) ÚMIDA TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE SE BENEFICIAR PELO TRATAMENTO COM UM ANTICORPO ANTI-VEGF, caracterizado por compreender a triagem para um polimorfismo genômico no alelo (C5) I802V do gene do componente C5 do complemento correspondendo a rs17611 em uma amostra isolada a partir do dito paciente, em que o paciente tem maior probabilidade de se beneficiar pelo dito tratamento se o genótipo correspondente compreende AA ou AG.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito anticorpo anti-VEGF se ligar ao mesmo epítopo do anticorpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 produzido pelo hibridoma ATCC® HB 10709.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo dito anticorpo anti-VEGF ter um domínio variável de cadeia pesada compreendendo as seguintes sequências de aminoácidos da região determinante de complementaridade (CDR) de cadeia pesada: CDRH1 (GYDFTHYGMN; SEQ ID NO: 1), CDRH2 (WINTYTGEPTYAADFKR; SEQ ID NO: 2) e CDRH3 (YPYYYGTSHWYFDV; SEQ ID NO: 3) e um domínio variável de cadeia leve compreendendo as seguintes sequências de aminoácidos da CDR de cadeia leve: CDRL1 (SASQDISNYLN; SEQ ID NO: 4), CDRL2 (FTSSLHS; SEQ ID NO: 5) e CDRL3 (QQYSTVPWT; SEQ ID NO: 6).

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito anticorpo anti-VEGF ser ranibizumab.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo genótipo correspondente compreender AA.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo genótipo correspondente compreender AG.

7. MÉTODO PARA PREDIZER SE UM INDIVÍDUO TEM UMA MAIOR PROBABILIDADE DE DESENVOLVER DMRI ÚMIDA OU DMRI SECA COM ATROFIA GEOGRÁFICA (AG), caracterizado por compreender a triagem para um polimorfismo genômico no alelo *C5 1802V* correspondente a rs17661 em uma amostra isolada a partir do dito paciente, em que o paciente tem maior probabilidade de desenvolver DMRI se o genótipo correspondente compreende o alelo para *ile*.