



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 018**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04765830 .7**

96 Fecha de presentación : **05.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1673472**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2006**

54 Título: **Uso de polimorfismos genéticos para predecir la hepatotoxicidad inducida por fármacos.**

30 Prioridad: **06.10.2003 US 508972 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2011

73 Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Mccullough, Karen y**
Wolfgang, Curt, Douglas

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 361 018 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de polimorfismos genéticos para predecir la hepatotoxicidad inducida por fármacos

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 Esta invención se relaciona en general con la prueba analítica de muestras de tejido *in vitro*, y más particularmente con el análisis de polimorfismos genéticos como biomarcadores para predecir la aparición de la hepatotoxicidad inducida por el fármaco.

DESCRIPCIÓN DEL OFICIO RELACIONADO

- 10 Entre los trastornos que surgen de la disfunción de la microvasculatura de pacientes diabéticos está la retinopatía, que se manifiesta clínicamente como el deterioro de la visión y puede resultar en ceguera. La retinopatía diabética se caracteriza por microaneurismas, excesiva permeabilidad vascular, zonas de la retina sin perfusión, y neovascularización de la retina. Muchas evidencias sugieren una relación causal entre altos niveles de glucosa en la sangre y el desarrollo de las lesiones subyacentes responsables de los déficits en la función de los órganos. Para una revisión, ver Way KJ et al., *Diabetic Medicine* 18: 945-59 (2001).

- 15 Entre los efectos de la hiperglucemia está la sobre-activación de la ruta de transducción de la señal diacilglicerol (DAG) - proteína quinasa C (PKC). Tanto los experimentos de cultivo celular como los modelos en animales de diabetes demostraron niveles excesivos y actividad de DAG y PKC en células endoteliales vasculares. Koya D & King GL, *Diabetes* 47: 859-866 (1998); Ishii H et al., *J Mol Med* 76: 21-31 (1998) and Way KJ et al., *Trends Pharmacol Sci* 21: 181-7 (2000). La activación de muchas de las isoformas de serina-treonina quinasas PKC es dependiente de DAG, un producto de división de los fosfolípidos de la membrana. Entre las isoformas activadas de serina-treonina quinasas PKC está la isoforma PKC β predominante, que se asocia con la retinopatía diabética. DAG usualmente se genera por la hidrólisis agonista-estimulada de los fosfolípidos de la membrana, pero también puede ser sintetizada *de novo* mediante el metabolismo directo de la glucosa. Dunlop ME & Larkins RG, *Biochem Biophys Res Commun* 132: 467-73 (1985); Ishii H et al., *J Mol Med* 76: 21-31 (1998). En respuesta a la hiperglucemia, la síntesis *de novo* de DAG aumenta sustancialmente, dando lugar a la activación de PKC β . Ishii H et al., *J Mol Med* 76: 21-31 (1998).
- 20
- 25

- 30 Como consecuencia de la activación continua de la ruta DAG-PKC, muchos aspectos de la función vascular se afectan. La activación de la citoquina y la adhesión de leucocitos se estimulan; el flujo sanguíneo y la contractilidad de microvasos se alteran; y la síntesis de la matriz extracelular aumenta, dando lugar al engrosamiento de las membranas basales. El microambiente retinal se hace isquémico como resultado de los cambios mencionados anteriormente. La expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente estimulador de la neovascularización, se incrementa en respuesta a la isquemia y por otros mecanismos dependientes de PKC β . Aiello LP et al., *Diabetes* 46: 1473-80 (1997).

- 35 La N-benzoil-estaurosporina (PKC412) es un inhibidor de ambos PKC y un receptor del VEGF esencial, KDR (Receptor que contiene el Dominio inserto de la quinasa, también conocido como VEGF-R2). La N-benzoil-estaurosporina que se desarrolla por varias indicaciones, incluyendo el tratamiento de edema macular diabético. Ver, U.S. Pat. No. 6,214,819. Ver también, U.S. Pat. Appln. 20030119812, 20030125343 y 20030153551. Aunque una medicación prometedor, el tratamiento con N-benzoil-estaurosporina puede resultar en efectos secundarios conocidos, incluyendo toxicidad del hígado. De esta manera, existe una necesidad en el oficio para reducir los efectos secundarios de los efectos secundarios de N-benzoil-estaurosporina.
- 40

RESUMEN DE LA INVENCION

- 45 La invención proporciona métodos para determinar los sujetos que están en riesgo de desarrollar la hepatotoxicidad inducida por el fármaco. En una modalidad, la invención se proporciona el uso del análisis genómico para identificar los pacientes en riesgo de experimentar la hepatotoxicidad durante la terapia con estaurosporina. En una modalidad particular, la terapia con estaurosporina involucra la administración de la N-benzoil-estaurosporina, para tratar el edema macular diabético. La predicción de la hepatotoxicidad involucra la determinación de niveles en suero de la aspartato transaminasa (AST). En otra modalidad, la invención proporciona los métodos para determinar las estrategias del tratamiento óptimo para estos pacientes.

- 50 La divulgación también proporciona ensayos clínicos, kits y reactivos para predecir la hepatotoxicidad antes de tomar un fármaco. En una modalidad, los kits contienen reactivos para determinar polimorfismos genéticos en el gen *IL1A*. En una modalidad particular, el polimorfismo genético está en el ID locus PG 279 del gen *IL1A*. En ensayos de polimorfismo genético del ID locus PG 279, el genotipo CC (SEQ ID NO:1) es un biomarcador de predicciones de riesgo mayor de la hepatotoxicidad, mientras que el genotipo CT (SEQ ID NOS:1 y 2) y el genotipo TT (SEQ ID NO:2), son biomarcadores de un riesgo inferior de la hepatotoxicidad. En otra modalidad, los kits contienen reactivos

para determinar polimorfismos genéticos en el gen *IL1A*. En una modalidad particular, el polimorfismo genético está en el ID locus PG 302 del gen *IL1A*. En ensayos de polimorfismo genético del ID locus PG 302, el genotipo GG (SEQ ID NO:3) es un biomarcador de predicciones de riesgo mayor de la hepatotoxicidad, mientras que el genotipo GT (SEQ ID NOS:3 y 4) y el genotipo TT (SEQ ID NO:4) son biomarcadores de un riesgo inferior de la hepatotoxicidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 muestra los niveles máximos de AST/ALT (aspartato aminotransferasa / alanina aminotransferasa) vs. *IL1A* (interleuquina 1-alfa; ID locus PG 279). Los gráficos de dispersión muestran (A) niveles máximos de aspartato aminotransferasa, (B) relación de ASTMAX y el límite superior normal (ULN), (C) niveles máximos de alanina aminotransferasa y (D) relación de ALT MAX y ULN de los sujetos en el ensayo clínico con genotipos de CC o T (CT o TT) para el ID locus PG 279 de *IL1A*. El límite superior normal para la aspartato aminotransferasa es 42 U/L para las edades de 3-64 y 55 U/L para 65 y más y para la alanina aminotransferasa es 48 U/L para todas las edades. Los ULNs se indican por una línea.

FIG. 2 muestra los niveles máximos de AST/ALT (aspartato aminotransferasa /alanina aminotransferasa) vs. *IL1A* (interleuquina 1-alfa; ID locus PG 302). Los gráficos de dispersión muestran esquemas de (A) niveles máximos de alanina aminotransferasa, (B) relación de ASTMAX y ULN, (C) niveles máximos de ALT y (D) relación de ALT MAX y ULN para sujetos en el ensayo clínico con genotipos de G o T (GT o TT) para el ID locus PG 302 de *IL1A*. El límite superior normal para la aspartato aminotransferasa es 42 U/L para las edades de 3-64 y 55 U/L para 65 y más y para la alanina aminotransferasa es 48 U/L para todas las edades. Los ULNs se indican por una línea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención ventajosamente proporciona una ruta para determinar, si un paciente experimentará hepatotoxicidad durante el tratamiento con el fármaco, antes de realmente tomar los fármacos. La divulgación por lo tanto proporciona regimenes de tratamiento más seguros para los pacientes ayudando a los médicos para ya sea (1) alterar la dosis del fármaco, (2) proporcionar medicación concomitante adicional o alternativa o (3) escoger no prescribir este fármaco para ese paciente.

Relevantes polimorfismos genéticos fueron identificados en un ensayo de fase II de búsqueda de dosis controlada-placebo multicentro, randomizado, doble ciego de N-benzoil-estaurosporina, que se condujo en sujetos con edema macular diabético. La seguridad de la N-benzoil-estaurosporina fue evaluada en los sujetos y la información farmacocinética adicional se recolectó. Mientras que la N-benzoil-estaurosporina mostró un buen perfil de seguridad, nueve de los 140 sujetos que fueron incluidos en el ensayo clínico experimentaron hepatotoxicidad, según se define por los aumentos dobles de las transaminasas en el hígado sobre el límite superior normal (ULN). Los sujetos fueron señalados como que habían experimentado hepatotoxicidad si cualquiera la aspartato aminotransferasa (AST) o la alanina aminotransferasa (ALT) tuvieron elevaciones dobles sobre el límite superior normal en la visita 3, 4 o 5.

De los dieciocho polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) a partir de los siete genes que fueron genotipados, dos en el gen *interleuquina 1-alfa* (*IL1A*) se asociaron con el nivel máximo en suero de la aspartato transaminasa registrado en las visitas 3, 4 o 5. *IL1A* codifica una citoquina inflamatoria que juega un papel esencial en la mediación de respuestas de fase aguda. Un polimorfismo de *IL1A* se localiza en la región promotora de *IL1A* y el otro resulta en una sustitución de la serina por alanina en la posición 114 del aminoácido. Estos resultados sugieren que los polimorfismos en *IL1A* o un gen localizado cerca de este en 2q14, se puede involucrar directamente con la aparición de la toxicidad del hígado después de, la administración de la N-benzoil-estaurosporina.

Como se utiliza en este documento, un polimorfismo en el locus genético de *IL1A* es "predictivo" de un "alto" riesgo de la hepatotoxicidad cuando el polimorfismo genético se correlaciona significativamente con el desarrollo de la hepatotoxicidad inducida por el fármaco o con elevados niveles en suero de la aspartato transaminasa. Ver, por ejemplo, a continuación, donde el genotipo CC en el ID locus PG 279 y el genotipo GG en el ID locus PG 302 son predictivos de un alto riesgo de la hepatotoxicidad. Como se utiliza en este documento, un polimorfismo en el locus genético de *IL1A* es "predictivo" de un "bajo" riesgo de la hepatotoxicidad cuando el polimorfismo genético se correlaciona significativamente con la ausencia del desarrollo de la hepatotoxicidad. Ver, por ejemplo, a continuación, donde el genotipo CT o TT en el ID locus PG 279 y el genotipo GT o TT en el ID locus PG 302 son predictivos de un bajo riesgo de la hepatotoxicidad. Las determinaciones de (valores p) significantes se pueden determinar, mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) o Exacta de Fisher. Las determinaciones de un polimorfismo SNP en un cierto sitio genético de *IL1A* como que tiene un alto riesgo de desarrollar hepatotoxicidad y otro polimorfismo SNP en dicho sitio genético de *IL1A* como que tiene un bajo riesgo de desarrollar hepatotoxicidad se pueden combinar para una mayor precisión de la determinación. Para los IDs locus PG 279 y 302, las asociaciones entre los polimorfismos de *IL1A* y los niveles en suero de la aspartato transaminasa tuvieron valores p de 0.0089 y 0.0097.

Estos resultados razonablemente se pueden extrapolar para la predicción de la hepatotoxicidad en pacientes que siguen la administración de cualquiera de los derivados de la estaurosporina, basándose en la similitud estructural y los modos de acción en el hígado de los derivados de la estaurosporina. Entre los derivados de la estaurosporina

están aquellos descritos en U.S. Pat. No. 5,093,330. Los compuestos preferidos son las N-acilestaurosporinas y sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo N-(2-aminoacetil)estaurosporina; N-(3,5-dinitrobenzoi)-estaurosporina; N-(3-carboxipropionil)estaurosporina; N-(3-fluorobenzoi)-estaurosporina; N-(3-nitrobenzoi)estaurosporina; N-(4-carboxibenzoil)estaurosporina; N-[(ter-butoxicarbonilamino)-acetil]-estaurosporina; N-alanilestaurosporina; N-benzoi estaurosporina; N-carboximetil-estaurosporina; N-etilestaurosporina; N-metilaminotiocarbonilestaurosporina; N-fenilcarbamoilestaurosporina; N-ter-butoxicarbonilestaurosporina; y N-trifluoracetilestaurosporina.

Por otra parte, los resultados se pueden extrapolar a la predicción de la hepatotoxicidad en pacientes que están siendo tratados para enfermedades diferentes de edema macular diabético. El método de la invención es aplicable a sujetos vertebrados, particularmente a sujetos mamíferos, más particularmente a sujetos humanos. La invención es particularmente aplicable a sujetos diabéticos.

El diagnóstico de la hepatotoxicidad se puede lograr utilizando ensayos de niveles en suero de enzimas. Los ensayos de enzimas en suero indicativos de disfunción del hígado son bien conocidos por aquellos de habilidad en el arte de la medicina y la rutina en laboratorios de hospitales. La definición de la hepatotoxicidad basándose en niveles en suero de la aspartato transaminasa (AST) y se utiliza en el EJEMPLO: La definición de la hepatotoxicidad utilizada en este análisis se basó en las veces de aumento en suero de la aspartato transaminasa o la alanina aminotransferasa sobre el límite superior normal (ULN) en las visitas 3, 4 o 5. El límite superior normal para la aspartato transaminasa en suero es 42 U/L para las edades de 3-64 y 55 U/L para edades de 65 y más; para la alanina aminotransferasa en suero el límite superior normal es 48 U/L (Smithkline Beecham Clinical Laboratories Reference Alert Ranges). Mientras que una elevación de cualquier enzima en la visita 3, 4 o 5 constituye hepatotoxicidad, las elevaciones de la transaminasa se descuidaron durante las posteriores visitas cuando el fármaco no estaba siendo administrado. Adicionalmente, los sujetos que tuvieron elevadas pruebas en función del hígado en el inicio (visita 2) no fueron marcados como que habían experimentado hepatotoxicidad, independientemente de la elevación en sus niveles enzimáticos después de la administración del fármaco. Nueve sujetos fueron señalados como que habían experimentado hepatotoxicidad. De estos, seis accedieron a los análisis farmacocinéticos clínicos.

Los individuos portadores de alelos polimórficos se pueden detectar en el ADN, el ARN, o el nivel proteínico utilizando una variedad de técnicas que son bien conocidas en el oficio. Las estrategias para la identificación y detección se describen en *por ejemplo*, EP 730,663, EP717,113, y PCTUS97/02102. Los métodos de la invención pueden involucrar la detección de polimorfismos pre-caracterizados. Es decir, la ubicación del genotipado y la naturaleza de formas polimórficas presentes en un sitio ya has sido determinadas (ver, la anterior discusión en relación con los genes cuestionados). La disponibilidad de esta información permite que los conjuntos de sondas que se designan para la identificación específica de las formas polimórficas conocidas. La identificación de los alelos que contienen polimorfismos de nucleótidos simples pueden involucrar la amplificación de ADN a partir de muestras diana. Esto se puede lograr mediante *por ejemplo*, PCR. Ver en general la Tecnología PCR: Principles and Applications for ADN Amplification, (ed. Erlich, Freeman Press, New York, New York, 1992); Protocolos de PCR: A Guide to Methods and Application (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990). La detección de los polimorfismos en secuencias de ADN específicas, se puede lograr mediante una variedad de métodos incluyendo, pero no limitado a, la detección del polimorfismo de longitud del fragmento de restricción basándose en la división de la endonucleasa de restricción específica de alelo (Kan & Dozy, Lancet II:910-912 (1978)), hibridación con sondas de oligonucleótido específico de alelo (Wallace et al, Nucl. Acids Res. 6:3543-3557 (1978)), incluyendo oligonucleótidos inmovilizados (Saiki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234 (1969)) o arreglos de oligonucleótidos (Maskos & Southern, Nucl. Acids Res. 21:2269-2270 (1993)), PCR específica de alelo (Newton et al., Nucl. Acids Res. 17:2503-2516 (1989)), detección de reparación de apareamientos erróneos (MRD) (Faham & Cox, Genome Res. 5:474-482 (1995)), enlace de proteína MutS (Wagner et al., Nucl. Acids Res. 23:3944-3948 (1995)), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Fisher & Lerman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1579-1583 (1983)), detección de polimorfismo de conformación de hebra única (Orita et al., Genomics 5:874-879 (1983)), transformación de la RNAsa en pares de base de apareamientos erróneos (Myers et al., Science 230:1242 (1985)), transformación de ADN heteroduplex química (Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:4397-4401 (1988)) o enzimática (Youil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:87-91 (1995)), métodos basados en extensión del cebador específico del alelo (Syvanen et al., Genomics 8:684-692 (1990)), análisis bit genético (GBA) (Nikiforov et al., Nucl. Acids Res. 22:4167-4175 (1994)), el ensayo de unión de oligonucleótido (OLA) (Landegren et al., Science 241:1077 (1988)), la reacción en cadena de unión específica de alelo (LCR) (Barrany, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:189-193 (1991)), gap-LCR (Abravaya et al., Nucl. Acids Res. 23:675-682 (1995)), secuenciación de ADN radioactiva y/o fluorescente utilizando procedimientos estándar bien conocidos en el oficio, y ensayos del ácido nucleico del péptido (PNA) (Orum et al., Nucl. Acids Res. 21:5332-5356 (1993); Thiede et al., Nucl. Acids Res. 24: 983-984 (1996)). Una orientación adicional se proporciona por Sambrook J et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000).

Una orientación del uso de la N-benzoi-estaurosporina y los derivados de la estaurosporina relacionados se proporciona en U.S. Pat. Nos. 5,744,460; 5,827,846; 6,018,042; 6,153,599 y 6,214,819. Una orientación adicional del uso de derivados de la estaurosporina relacionados con la N-benzoiestaurosporina para tratar enfermedades oculares neovasculares y en la disminución de la permeabilidad capilar en la retina se proporciona en U.S. Pat. Appns. 20030119812, 20030125343 y 20030153551

Polimorfismos de Nucleótido Simple. La variación de la secuencia en el genoma humano consiste en primer lugar de polimorfismos de nucleótidos simples ("SNPs") con el remanente de las variaciones de secuencia siendo repeticiones en tándem cortas (incluyendo micro-satélites), repeticiones en tándem largas (mini-satélite) y otras inserciones y deleciones. Un SNP es una posición en la cual dos bases alternativas ocurren a la frecuencia apreciable (*i.e.* >1%) en la población humana. Un SNP se dice que es "alélico" en que debido a la existencia del polimorfismo, algunos miembros de una especie pueden tener secuencia sin mutar (*i.e.*, el "alelo" original) mientras que otros miembros pueden tener una secuencia mutada (*i.e.*, el alelo mutante o variante). En el caso más simple, solo una secuencia mutada puede existir, y el polimorfismo se dice que es dialélico. La ocurrencia de mutaciones alternativas, puede dar lugar a polimorfismos trialélicos, *etc.* Los SNPs son ampliamente extendidos por todo el genoma y los SNPs que alteran la función de un gen pueden ser directos colaboradores a la variación fenotípica. Debido a su prevalencia y naturaleza generalizada, los SNPs tienen el potencial de ser herramientas importantes para localizar los genes que se involucran en afecciones de enfermedades humanas, *ver por ejemplo*, Wang et al., Science 280: 1077-1082 (1998), que revela un estudio piloto en el cual 2,227 SNPs fueron mapeados sobre una región megabase 2.3 de ADN.

Una asociación entre un polimorfismo de nucleótidos simples y un fenotipo particular no indica o necesita que el SNP sea causativo del fenotipo. En cambio, esta asociación puede indicar solo que el SNP se localiza cerca del sitio en el genoma donde los factores de determinación para el fenotipo existen y por consiguiente es más probable que se encuentre en asociación con estos factores de determinación y de esta manera con el fenotipo de interés. De esta manera, un SNP puede estar en desequilibrio de ligamiento (LD) con la variante funcional "verdadera". LD, también conocido como asociación alélica existe cuando alelos en dos localizaciones distintas del genoma están altamente relacionadas más de lo esperado.

De esta manera un SNP puede servir como un marcador que tiene valor en virtud de su proximidad a una mutación que causa un fenotipo particular.

Los SNPs que se asocian con la enfermedad también pueden tener un efecto directo en la función del gen en el cual ellos se localizan. Una variante de secuencia puede resultar en un cambio de aminoácido o puede alterar el corte y empalme exón-intrón, modificando así directamente la proteína relevante, o puede existir en una región reguladora, alterando el ciclo de expresión o la estabilidad del ARNm, *ver* Nowotny P Current Opinions in Neurobiology 11:637-641 (2001).

Cada vez es más claro que el riesgo de desarrollar muchos trastornos comunes y el metabolismo de medicaciones utilizadas para tratar estas condiciones se influyen sustancialmente por variaciones genómicas subyacentes, aunque los efectos de cualquier variante pueden ser pequeños.

Por lo tanto, una asociación entre un SNP y un fenotipo clínico sugiere, (1) el SNP es funcionalmente responsable del fenotipo o, (2) existen otras mutaciones cerca de la ubicación del SNP en el genoma que causa el fenotipo. La 2ª posibilidad se basa en la biología de herencia. Grandes piezas de ADN son heredadas y los marcadores muy cerca uno del otro pueden no haber sido recombinados en individuos que no están relacionados por muchas generaciones, *i.e.*, los marcadores están en desequilibrio de ligamiento (LD).

Identificación y caracterización de SNPs. Muchas diferentes técnicas pueden ser utilizadas para identificar y caracterizar los SNPs, incluyendo análisis de polimorfismo de conformación de única hebra, análisis heteroduplex mediante la cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (DHPLC), secuenciación de ADN directa y métodos de cálculo, *ver* Shi MM, Clin Chem 47:164-172 (2001). Gracias a la riqueza de la información de la secuencia en bases de datos públicas, las herramientas de cálculo pueden ser utilizadas para identificar SNPs *in silico* por la alineación de las secuencias sometidas independientemente para un gen dado (cualquiera de las secuencias genómicas o ADNc). La comparación de SNPs obtenidos experimentalmente y por métodos *in silico* mostró que el 55% de SNPs candidatos encontrados por SNPfinder(<http://lpgws.nci.nih.gov:82/perl/snp/snp.cgi.pl>) también se han descubierto experimentalmente, *ver*, Cox et al. Hum Mutat 17:141-150 (2001). Sin embargo, estos métodos *in silico* podrían solo encontrar 27% de SNPs verdaderos.

Los métodos de tipificación de SNP más comunes en la actualidad incluyen hibridación, extensión de cebador y métodos de transformación. Cada uno de estos métodos se debe conectar a un sistema de detección apropiado. Las tecnologías de detección incluyen polarización fluorescente, (*ver* Chan X et al. Genome Res 9:492-499 (1999)), detección luminométrica de liberación de pirofosfato (pirosecuenciación), (*ver* Ahmadian A et al., Anal Biochem 280:103-110 (2000)), ensayos de transformación basados en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), DHPLC, y espectrometría de masas, (*ver* Shi MM, Clin Chem 47:164-172 (2001) y U.S. Pat. No. 6,300,076 B1). Otros métodos de detección y caracterización de SNPs son aquellos revelados en U.S. Patents No. 6,297,018 B1 y 6,300,063 B1.

En una modalidad particularmente preferida, la detección del polimorfismo se puede lograr mediante los métodos de la tecnología así llamada INVADER™ (disponible de Third Wave Technologies Inc. Madison, Wisconsin, USA). En este ensayo, un oligonucleótido "invader" en dirección 5' específico y una sonda en dirección 3' parcialmente superpuesta, juntos forman una estructura específica cuando se unen a una plantilla de ADN complementario. Esta estructura se reconoce y corta en un sitio específico por la enzima Cleavasa, y esto resulta en la liberación del flap 5'

del oligonucleótido sonda. Este fragmento luego sirve como el oligonucleótido "invader" con respecto a las sondas dirigidas secundarias sintéticas y de señal marcadas fluorescentemente secundarias contenidas en la mezcla de reacción. Estos resultados en la transformación específica de las sondas de señal secundarias mediante la enzima Cleavasa. La señal de fluorescencia se genera cuando esta sonda secundaria, marcada con moléculas colorantes capaces de transferir la energía de resonancia de fluorescencia, se divide. Las Cleavasas tienen requisitos rigurosos relativos con la estructura formada por las secuencias de ADN o flaps superpuestos y pueden, por consiguiente, ser utilizados para detectar específicamente apareamientos erróneos de pares de base únicos inmediatamente en la dirección 5' del sitio de transformación en la hebra de ADN en la dirección 3'. Ver Ryan D et al. Molecular Diagnosis 4(2):135-144 (1999) and Lyamichev V et al. Nature Biotechnology 17:292-296 (1999), ver también US Patents 5,846,717 y 6,001,567.

En algunas modalidades, una composición contiene dos o más oligonucleótidos de genotipado marcados de modo diferente para probar simultáneamente la identidad de nucleótidos en dos o más sitios polimórficos. También se contempla que las composiciones del cebador pueden contener dos o más conjuntos de pares de cebador específico de alelo para permitir la amplificación y orientación simultánea de dos o más regiones que contienen un sitio polimórfico.

Los oligonucleótidos del genotipado también pueden ser inmovilizados o sintetizados en una superficie sólida tal como un microchip, cuenta o lámina de vidrio (ver, *por ejemplo*, WO 98/20020 y WO 98/20019). Tales oligonucleótidos genotipados inmovilizados se pueden utilizar en una variedad de ensayos de detección de polimorfismo, incluyendo pero no limitado a ensayos de hibridación de sonda y extensión de polimerasa. Los oligonucleótidos genotipados inmovilizados pueden comprender un arreglo ordenado de oligonucleótidos diseñado para detectar rápidamente una muestra de ADN para polimorfismos en múltiples genes al mismo tiempo.

Un cebador oligonucleótido específico de alelo tiene un nucleótido terminal 3', o preferiblemente un nucleótido penúltimo 3', que es complementario a solo un nucleótido de un SNP particular, actuando así como un cebador de la extensión mediada por la polimerasa solo si el alelo que contiene ese nucleótido está presente. Los cebadores de oligonucleótido específicos de alelo hibridando a cualquiera la hebra codificante o no-codificante también se contemplan. Un cebador ASO para detectar polimorfismos genéticos se pueden desarrollar utilizando técnicas conocidas por aquellos de habilidad en el oficio.

Otros oligonucleótidos genotipados hibridizan a una región diana localizada uno a varios nucleótidos en la dirección 3' de uno de los sitios polimórficos novedosos identificados en este documento. Tales oligonucleótidos son útiles en métodos de extensión de cebador mediado por la polimerasa para detectar uno de los novedosos polimorfismos descritos en este documento y por consiguiente tales oligonucleótidos genotipados se denominan en este documento como "oligonucleótidos cebador-extensión". En una modalidad preferida, el terminal 3' de un oligonucleótido cebador-extensión es un desoxinucleótido complementario al nucleótido localizado inmediatamente adyacente al sitio polimórfico.

En otra modalidad, la divulgación proporciona un kit que comprende al menos dos oligonucleótidos genotipados envasados en recipientes separados. El kit también puede contener otros componentes tales como solución reguladora de hibridación (donde los oligonucleótidos son para ser utilizados como una sonda) envasada en un recipiente separado. Como alternativa, donde los oligonucleótidos son para ser utilizados para amplificar una región diana, el kit puede contener, envasados en recipientes separados, una polimerasa y una solución reguladora de reacción optimizada por extensión del cebador mediado por la polimerasa, tales como PCR.

Las composiciones de oligonucleótido y kits descritos anteriormente son útiles en métodos de genotipado y/o haplotipado del gen en un individuo. Como se utiliza en este documento, los términos "genotipo" y "haplotipo" significan el genotipo o haplotipo que contiene el par de nucleótidos o nucleótido, respectivamente, que está presente en uno o más de los sitios polimórficos novedosos descritos en este documento y opcionalmente también puede incluir el par de nucleótidos o nucleótido presentes en uno o más sitios polimórficos adicionales en el gen. Los sitios polimórficos adicionales pueden ser sitios polimórficos conocidos en la actualidad o sitios que posteriormente se descubren.

Una modalidad del método de genotipado involucra el aislamiento a partir de una mezcla de ácido nucleico el individuo, que comprende las dos copias del gen, o un fragmento de este, que están presentes en el individuo, y la determinación de la identidad del par de nucleótidos en uno o más de los sitios polimórficos en las dos copias para asignar un genotipo con el individuo. Como se entenderá fácilmente por el experto, las dos "copias" de un gen en un individuo pueden tener el mismo alelo o pueden tener diferentes alelos. En una modalidad particularmente preferida, el método de genotipado comprende la determinación de la identidad del par de nucleótidos en cada sitio polimórfico.

Por lo general, la mezcla de ácido nucleico se aísla a partir de una muestra biológica tomada del individuo, tales como una muestra de sangre o muestra de tejido. Las muestras de tejido apropiadas incluyen sangre total, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, frotis bucal, piel y cabello. La mezcla de ácidos nucleicos se puede componer de ADN genómico, ARNm, o ADNc y, en los últimos dos casos, la muestra biológica se debe obtener a partir de un órgano en el cual el gen se expresa. Adicionalmente se entenderá por el experto que las preparaciones

de ARNm o ADNc no se podrían utilizar para detectar polimorfismos localizados en intrones o en las regiones no transcritas 5' y 3'. Si un fragmento del gen se aísla, debe contener el o los sitios polimórficos que es genotipado.

Una modalidad del método de haplotipado comprende el aislamiento de una molécula de ácido nucleico a partir de un individuo, que contiene solo una de las dos copias del gen, o un fragmento de este, que está presente en el individuo y la determinación en que copia la identidad del nucleótido en uno o más de los sitios polimórficos en esta copia para asignar un haplotipo para el individuo. El ácido nucleico se puede aislar utilizando cualquier método capaz de separar las dos copias del gen o fragmento, incluyendo pero no limitando a, uno de los métodos descritos anteriormente para preparar los isogenes, con la clonación dirigida *in vivo* siendo el enfoque preferido. Como será apreciado fácilmente por aquellos de habilidad en el oficio, cualquier clon individual solo proporcionará la información del haplotipo en una de las dos copias del gen presente en un individuo. Si la información del haplotipo se desea para la otra copia del individuo, se necesitarían clones adicionales para ser examinados. Por lo general, al menos cinco clones serían examinados para tener más de un 90% de probabilidad del haplotipado de ambas copias del gen en un individuo. En una modalidad particularmente preferida, el nucleótido en cada uno de los sitios polimórficos se identifica.

En una modalidad preferida, un par de haplotipo se determina para un individuo, mediante la identificación de la secuencia de nucleótidos en fases en uno o más de los sitios polimórficos en cada copia del gen que están presentes en el individuo. En una modalidad particularmente preferida, el método de haplotipado comprende la identificación de la secuencia de nucleótidos en fases en cada sitio polimórfico en cada copia del gen. Cuando el haplotipado de ambas copias del gen, la etapa de identificación preferiblemente se realiza con cada copia del gen siendo colocada en recipientes separados. Sin embargo, también se prevé que si las dos copias se marcan con diferentes etiquetas, o son de otra manera identificables o distinguibles por separado, podría ser posible en algunos casos desarrollar el método en el mismo recipiente. Por ejemplo, si la primera y la segunda copias del gen se marcan con diferentes el primer y segundo colorante fluorescente, respectivamente, y un oligonucleótido específico de alelo marcado con incluso un tercer colorante fluorescente diferente, se utiliza, para ensayar el(los) sitio(s) polimórfico(s), entonces detectando una combinación del primer y tercer colorantes se debería identificar el polimorfismo en la primera copia del gen, mientras que se detecta una combinación del segundo y tercer colorante se debería identificar el polimorfismo en la segunda copia del gen.

En ambos el método de genotipado y de haplotipado, la identidad de un nucleótido (o par de nucleótidos) en un sitio(s) polimórfico(s) se puede determinar mediante la amplificación de una región(s) diana(s) que contiene el o los sitios polimórficos directamente a partir de una o ambas copias del gen, o fragmentos de esta, y la secuencia de la región(s) amplificada(s) determinada(s) por los métodos convencionales. Será apreciado fácilmente por el experto que solo un nucleótido será detectado en un sitio polimórfico en individuos que son homocigotos en este sitio, mientras que dos diferentes nucleótidos serán detectados si el individuo es heterocigoto para este sitio. El polimorfismo se puede identificar directamente, se conoce como identificación del tipo positivo, o por inferencia, denominado como identificación del tipo negativo. Por ejemplo, donde un SNP se conoce que es la guanina y la citosina en una población de referencia, un sitio se puede determinar positivamente por ser cualquiera guanina o citosina para un individuo homocigoto enfermo en ese sitio, o ambas guanina y citosina, si el individuo es heterocigoto en ese sitio. Como alternativa, el sitio se puede determinar negativamente por no ser guanina (y de esta manera citosina/citosina) o no ser citosina (y de esta manera guanina/guanina).

Además, la identidad del o los alelos presentes en cualquiera de los sitios polimórficos novedosos descritos en este documento, se puede determinar indirectamente por el genotipado de un sitio polimórfico no revelado en este documento que está en desequilibrio de ligamiento con el sitio polimórfico que es de interés. Se dice que, dos sitios están en desequilibrio de ligamiento, si la presencia de una variante particular en un sitio mejora la previsibilidad de otra variante en el segundo sitio (*ver*, Stevens JC, Mol Diag 4:309-317 (1999)). Los sitios polimórficos en desequilibrio de ligamiento con los sitios polimórficos actualmente revelados pueden ser localizados en regiones del gen o en otras regiones genómicas no examinadas en este documento. El genotipado de un sitio polimórfico en desequilibrio de ligamiento con los sitios polimórficos novedosos descritos en este documento se puede llevar a cabo mediante, pero no se limita a, cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para detectar la identidad del alelo en un sitio polimórfico.

La(s) región(s) diana(s) pueden ser amplificadas utilizando cualquier método de amplificación dirigida de oligonucleótido, incluyendo pero no limitando a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (U.S. Pat. No. 4,965,188), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barany et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:189-193 (1991); PCT patent application WO 90/01069), y ensayo de ligamiento de oligonucleótido (OLA) (Landegren et al., Science 241:1077-1080 (1988)). Los oligonucleótidos útiles como cebadores o sondas en dichos métodos deberían hibridar específicamente a una región del ácido nucleico que contiene o es adyacente al sitio polimórfico. Por lo general, los oligonucleótidos tienen entre 10 y 35 nucleótidos de longitud y preferiblemente, entre 15 y 30 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, los oligonucleótidos tienen de 20 a 25 nucleótidos de largo. La longitud exacta del oligonucleótido dependerá de muchos factores que rutinariamente se consideran y practican por el experto.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos se pueden utilizar para amplificar la región diana incluyendo sistemas de amplificación basados en la transcripción (U.S. Pat. No. 5,130,238; EP 329,822; U.S. Pat. No. 5,169,766, WO 89/06700) y métodos isotérmicos (Walker et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:392-396 (1992)).

- Un polimorfismo en la región diana también se puede ensayar antes o después de la amplificación utilizando uno de varios métodos basados en la hibridación conocidos en el oficio. Por lo general, los oligonucleótidos específicos de alelo se utilizan para llevar a cabo tales métodos. Los oligonucleótidos específicos de alelo, se pueden utilizar como pares de sonda marcadas de forma diferente, con un miembro del par que muestra una correspondencia perfecta con una variante de una secuencia diana y el otro miembro que muestra una correspondencia perfecta con una variante diferente. En algunas modalidades, más de un sitio polimórfico se puede detectar a la vez utilizando un conjunto de oligonucleótidos específicos de alelo o pares de oligonucleótidos. Preferiblemente, los miembros del conjunto tienen temperaturas de fusión dentro de los 5°C y más preferiblemente dentro de 2°C, de cada otro cuando se hibridiza a cada uno de los sitios polimórficos que se detectan.
- La hibridación de un oligonucleótido específico de alelo a un polinucleótido diana se puede llevar a cabo con ambas entidades en solución o tal hibridación se puede llevar a cabo cuando cualquiera el oligonucleótido o el polinucleótido diana se fija covalentemente o no covalentemente a un soporte sólido. Adjunto se puede mediar, por ejemplo, por interacciones anticuerpo-antígeno, poly-L-Lys, estreptavidina o avidina-biotina, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas, enlaces químicos, coacción de reticulado UV, etc. Los oligonucleótidos específicos de alelo pueden ser sintetizados directamente en el soporte sólido o unido al soporte sólido después de la síntesis. Los soportes sólidos apropiados para utilizar en métodos de detección de la invención incluyen sustratos hechos de silicio, vidrio, plástico, papel y similares, que pueden ser formados, por ejemplo, en pozos (como en placas de 96-pozos), portaobjetos, láminas, membranas, fibras, trozos, placas, y lechos. El soporte sólido se puede tratar, recubrir o derivatizar para facilitar la inmovilización del oligonucleótido específico de alelo o ácido nucleico diana.
- El genotipo o haplotipo para el gen de un individuo también puede ser determinado mediante la hibridación de una muestra de nucleico que contiene una o ambas copias del gen a arreglos y subarreglos de ácidos nucleicos, tal como se describe en WO95/11995. Los arreglos deberían contener una batería de oligonucleótidos específicos de alelo que representan cada uno de los sitios polimórficos que se incluyen en el genotipo o haplotipo.
- La identidad de los polimorfismos también puede ser determinada utilizando una técnica de detección de apareamiento erróneo, incluyendo pero no limitado al método de protección de RNasa utilizando ribosondas (Winter et al., Proc Natl Acad Sci USA 82:7575 (1985); Meyers et al., Science 230:1242 (1985)) y proteínas que reconocen apareamientos erróneos de nucleótidos, tales como la proteína mutS *E. coli* (Modrich P. Ann Rev Genet 25:229-253 (1991)). Como alternativa, alelos variantes se pueden identificar mediante el análisis de polimorfismo de conformación de hebra única (SSCP) (Orita et al., Genomics 5:874-879 (1989); Humphries et al., in Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, R. Elles, ed., pp. 321-340 (1996)) o electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Wartell et al., Nucl Acids Res 18:2699-2706 (1990); Sheffield et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:232-236 (1989)).
- Un método de extensión mediada por la polimerasa de cebador también puede ser utilizado para identificar el polimorfismo(s). Varios de tales métodos han sido descritos en la literatura de patentes y científica e incluyen el método "Genetic Bit Analysis" (WO 92/15712) y el análisis bit genético mediado ligasa/polimerasa (U.S. Pat. No. 5,679,524). Los métodos relacionados se revelan en WO91/02087, WO90/09455, WO95/17676, U.S. Pat. Nos. 5,302,509 y 5,945,283. Los cebadores extendidos que contienen un polimorfismo se pueden detectar por espectrometría de masas como se describe en U.S. Pat. No. 5,605,798. Otro método de extensión de cebador es PCR específica de alelo (Ruafio et al., Nucl Acids Res 17:8392 (1989); Ruafio et al., Nucl Acids Res 19:6877-6882 (1991); WO93/22456; Turki et al., J Clin Invest 95:1635-1641 (1995)). Además, múltiples sitios polimórficos pueden ser investigados por regiones múltiples de amplificación de manera simultánea del ácido nucleico utilizando conjuntos de cebadores específicos de alelo como se describe en WO 89/10414.
- En una modalidad preferida, los datos de frecuencia de haplotipo para cada grupo etnogeográfico se examina para determinar si es consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg. El equilibrio de Hardy-Weinberg (D.L. Hartl et al., Principes de Population Genomics, 3rd Ed. (Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1997) postula que la frecuencia de encontrar el par de haplotipo $H1/H2$ es igual a $PH-W (H1/H2) = 2p(H1) p (H2)$ si $H1 \neq H2$ y $PH-W (H1/H2) = p (H1) p (H2)$ si $H1 = H2$. Una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias de haplotipo observadas y esperadas podría ser debida a uno o más factores incluyendo la consanguinidad significativa en el grupo de población, presión selectiva fuerte sobre el gen, sesgo del muestreo, y/o errores en el proceso de genotipado. Si grandes desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg se observan en un grupo etnogeográfico, el número de individuos en que grupo puede ser aumentado para ver si la desviación se debe a un sesgo del muestreo. Si un tamaño de muestra grande no reduce la diferencia entre las frecuencias de par de haplotipo observadas y esperadas, entonces uno podría considerar el haplotipado del individuo utilizando un método de haplotipado directo tales como, por ejemplo, tecnología CLASPER System™ (U.S. Pat. No. 5,866,404), SMD, o PCR de rango grande específico de alelo (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24:4841-4843 (1996)).
- En una modalidad de este método para predecir un par de haplotipo, la etapa de asignación involucra realizar el siguiente análisis. Primero, cada uno de los posibles pares de haplotipos se compara con los pares de haplotipos en la población referencia. Por lo general, solo uno de los pares de haplotipos en la población referencia corresponde a un posible par de haplotipo y ese par se asigna al individuo. Ocasionalmente, solo un haplotipo representado en los pares de haplotipos referencia es consistente con un posible par de haplotipo para un individuo, y en tales casos el individuo se asigna un par de haplotipo que contiene este conocido haplotipo y un nuevo haplotipo derivado por la

5 sustracción del conocido haplotipo a partir del posible par de haplotipo. En raros casos, ninguno de los haplotipos en la población referencia es consistente con los posibles pares de haplotipos, o alternativamente, pares de haplotipos referencia múltiples son consistentes con los posibles pares de haplotipos. En tales casos, el individuo preferiblemente se somete a haplotipado utilizando un método de haplotipado molecular directo tal como, por ejemplo, tecnología CLASPER System™ (U.S. Pat. No. 5,866,404), SMD, o PCR específica de alelo de rango grande (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24:4841-4843 (1996)).

10 La divulgación también proporciona un método para determinar la frecuencia de un genotipo o haplotipo en una población. El método comprende la determinación del genotipo o el par de haplotipos para el gen que está presente en cada miembro de la población, en donde el genotipo o haplotipo comprende el par de nucleótidos o nucleótido detectado en uno o más de los sitios polimórficos en el gen, y el cálculo de la frecuencia de cualquier genotipo o haplotipo particular se encuentra en la población. La población puede ser una población referencia, una población de familia, una población del mismo sexo, un grupo de población, una población característica (*por ejemplo*, un grupo de individuos que muestra un rasgo de interés tal como una condición médica o respuesta a un tratamiento terapéutico).

15 En otro aspecto de la divulgación, los datos de frecuencia de los genotipos y/o los haplotipos encontrados en una población de referencia se utilizan en un método de identificación de una asociación entre un rasgo y un genotipo o un haplotipo. El rasgo puede ser cualquier fenotipo detectable, incluyendo pero no limitado a la susceptibilidad a una enfermedad o respuesta a un tratamiento. El método consiste en obtener los datos en la frecuencia del genotipo(s) o haplotipo(s) de interés en una población de referencia, también como en una población que muestra el rasgo. Los datos de frecuencia para una o ambas de las poblaciones características y de referencia, se pueden obtener mediante el genotipado o haplotipado de cada individuo en las poblaciones utilizando uno de los métodos descritos anteriormente. Los haplotipos para la población característica se pueden determinar directa o, alternativamente, por el genotipo predictivo para la metodología del haplotipo descrita anteriormente.

25 En otra modalidad, los datos de frecuencia para las poblaciones características y de referencia se obtienen mediante el acceso a datos de frecuencia determinados previamente, que puede ser en forma escrita o electrónica. Por ejemplo, los datos de frecuencia pueden estar presentes en una base de datos que es accesible por un ordenador. Una vez que los datos de frecuencia se obtienen, las frecuencias de genotipo(s) o haplotipo(s) de interés en las poblaciones características y de referencia se comparan. En una modalidad preferida, las frecuencias de todos los genotipos y/o haplotipos observados en la población se comparan. Si un genotipo o haplotipo particular para el gen es más frecuente en la población característica, que en la población referencia a una cantidad estadísticamente significativa, luego el rasgo se prevé que se asocia con ese genotipo o haplotipo.

30 En una modalidad preferida, un análisis estadístico se lleva a cabo mediante el uso de ensayos ANOVA estándar con una corrección de Bonferoni y/o un método bootstrapping que estimula la correlación genotipo fenotipo muchas veces y calcula un valor significativo. Cuando muchos polimorfismos se están analizando una corrección del factor se puede llevar a cabo para corregir una asociación significativa, que se puede encontrar por casualidad. Para los métodos estadísticos, utilizados en los métodos de esta divulgación, ver: Statistical Methods in Biology, 3rd edition, Bailey NTJ, (Cambridge Univ. Press, 1997); Introduction to Computational Biology, Waterman MS (CRC Press, 2000) y Bioinformatics, Baxevanis AD & Ouellette BFF editors (John Wiley & Sons, Inc., 2001).

35 En una modalidad preferida del método, el rasgo de interés es una respuesta clínica mostrada por un paciente a algún tratamiento terapéutico, por ejemplo, respuesta a un fármaco que se dirige o respuesta a un tratamiento terapéutico para una condición médica.

40 En otra modalidad, un genotipo o haplotipo detectable que está en desequilibrio de ligamiento con el genotipo o haplotipo de interés se pueden utilizar como un marcador sustituto. Un genotipo que está en desequilibrio de ligamiento con un genotipo puede ser descubierto mediante la determinación de, sí un genotipo o haplotipo particular del gen es más frecuente en la población lo que también demuestra el potencial genotipo marcador sustituto que en la población referencia a una cantidad estadísticamente significativa, entonces el genotipo marcador se prevé que se asocia con ese genotipo o haplotipo y entonces puede ser utilizado como un marcador sustituto en lugar del genotipo.

45 *Definiciones.* Como se utiliza en este documento, "condición médica" incluye pero no se limita a cualquier afección o enfermedad manifestada como uno o más síntomas físicos y/o psicológicos por los que el tratamiento es deseable, e incluye enfermedades previamente y recientemente identificadas y otros trastornos.

50 Como se utiliza en este documento, el término "respuesta clínica" significa cualquiera o todas las siguientes: una medición cuantitativa de la respuesta, no respuesta, y respuesta adversa (i.e., efectos secundarios).

55 Con el fin de deducir una correlación entre la respuesta clínica a un tratamiento y un genotipo o haplotipo, los datos se obtienen en las respuestas clínicas mostradas por una población de individuos que reciben el tratamiento, de ahora en adelante la "población clínica". Estos datos clínicos pueden ser obtenidos mediante el análisis de los resultados de un ensayo clínico que ya ha sido corrido y/o los datos clínicos se pueden obtener mediante el diseño y llevando a cabo una o más nuevas pruebas clínicas.

Como se utiliza en este documento, el término "ensayo clínico" significa cualquier estudio de investigación diseñado para recolectar los datos clínicos en las respuestas a un tratamiento particular, e incluye pero no se limita a pruebas clínicas de fase I, fase II y fase III. Los métodos estándar se utilizan para definir la población de pacientes y para inscribir los sujetos.

- 5 Se prefiere que los individuos incluidos en la población clínica se han clasificados por la existencia de la condición médica de interés. Esta clasificación de potenciales pacientes podría emplear un examen físico estándar o una o más pruebas de lab. Como alternativa, la clasificación de pacientes podría utilizar el haplotipado para situaciones donde existe una fuerte correlación entre par de haplotipos y susceptibilidad o severidad de la enfermedad.

10 El tratamiento terapéutico de interés se administra a cada individuo en la población de ensayo y cada respuesta del individuo al tratamiento se mide utilizando uno o más criterios predeterminados. Se contempla que en muchos casos, la población de ensayo mostrará un rango de respuestas y que el investigador escogerá el número de grupos con respuesta (*por ejemplo*, baja, media, alta) formada por las diferentes respuestas. Además, el gen para cada individuo en la población de ensayo es genotipado y/o haplotipado, lo que se puede hacer antes o después de administrar el tratamiento.

15 Después de que ambos los datos clínicos y de polimorfismo han sido obtenidos, las correlaciones entre respuesta del individuo y contenido de genotipo o haplotipo, se crean. Las correlaciones se pueden producir de varias maneras. En un método, los individuos se agrupan por su genotipo o haplotipo (o par de haplotipos) (también denominados como un grupo de polimorfismo), y luego las medias y desviaciones estándar de las respuestas clínicas mostradas por los miembros de cada grupo de polimorfismo se calculan.

20 Estos resultados luego se analizan para determinar si cualquier variación observada en respuesta clínica entre grupos de polimorfismo es estadísticamente significativa. Los métodos de análisis estadístico que se pueden utilizar se describen en L.D. Fisher & G. vanBelle, *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences* (Wiley-Interscience, New York, 1993). Este análisis también puede incluir un cálculo de regresión de cuales sitios polimórficos en el gen dan la contribución más significativa con las diferencias en el fenotipo.

25 Un segundo método para encontrar las correlaciones entre el contenido de haplotipo y las respuestas clínicas, utiliza modelos predictivos basados en los algoritmos de optimización de la minimización del error. Uno de muchos algoritmos de optimización posible es un algoritmo genético (R. Judson, "Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry" in *Reviews in Computational Chemistry*, Vol. 10, pp. 1- 73, K.B. Lipkowitz & D.B. Boyd, eds. (VCH Publishers, New York, 1997). Alineamiento estimulado (Press et al., "Numerical Recipes in C: The Art de Scientific Computing", Cambridge University Press (Cambridge) 1992, Ch. 10), redes neurales (E. Rich and K. Knight, "Artificial Intelligence", 2nd Edition (McGraw-Hill, New York, 1991, Ch. 18), métodos de descenso con gradiente estándar (Press *et al.*, *supra* Ch. 10), u otras tecnologías de optimización global o local (ver discusión en Judson, *supra*) también podrían ser utilizados.

35 Las correlaciones también pueden ser analizadas utilizando técnicas de análisis de variación (ANOVA) para determinar cuánto de la variación en los datos clínicos se explica por diferentes subconjuntos de los sitios polimórficos en el gen. ANOVA se utiliza para probar la hipótesis acerca de si una respuesta variable se causa por o se correlaciona con uno o más rasgos o variables que se pueden medir (Fisher & vanBelle, *supra*, Ch. 10).

A partir de los análisis descritos anteriormente, un modelo matemático se puede construir fácilmente por el experto que predice la respuesta clínica como una función de contenido de genotipo o haplotipo.

40 La identificación de una asociación entre una respuesta clínica y un genotipo o haplotipo (o par de haplotipos) del gen, puede ser la base para el diseño de un método de diagnóstico para determinar aquellos individuos que responderán o no responderán al tratamiento, o alternativamente, responderán a un nivel inferior y de esta manera puede necesitar más tratamiento, *i. e.*, una mayor dosis de un fármaco. El método de diagnóstico puede tomar una de varias formas: por ejemplo, una prueba de ADN directa (*i.e.*, genotipado o haplotipado de uno o más de los sitios polimórficos en el gen), una prueba serológica, o una medición de examen físico. El único requisito es que exista una buena correlación entre los resultados de la prueba de diagnóstico y el genotipo o haplotipo subyacente que a su vez se correlaciona con la respuesta clínica. En una modalidad preferida, este método de diagnóstico utiliza el método predictivo de haplotipado descrito anteriormente.

50 Un ordenador puede implementar cualquiera o todas las operaciones analíticas y matemáticas involucradas en la práctica de los métodos de la presente divulgación. Además, el ordenador puede ejecutar un programa que genere las vistas (o pantallas) mostradas en un dispositivo de pantalla y con el que el usuario puede interactuar para ver y analizar grandes cantidades de información relativa al gen y su variación genómica, incluyendo ubicación de cromosoma, estructura de gen, y familia de genes, datos de expresión génica, datos de polimorfismo, datos de secuencia genética, y datos de población de datos clínicos (*por ejemplo*, datos en origen etnogeográfico, respuestas clínicas, genotipos, y haplotipos para una o más poblaciones). Los datos de polimorfismo descritos en este documento, se pueden almacenar como parte de una base de datos relacional (*por ejemplo*, una instancia de una base de datos Oracle o un conjunto de archivos ASCII flat). Estos datos de polimorfismo se pueden almacenar en el disco duro del ordenador o pueden, por ejemplo, ser almacenados en un CD-ROM o en uno u otros dispositivos de

almacenamiento accesibles por el ordenador. Por ejemplo, los datos se pueden almacenar en una o más de las bases de datos en comunicación con el ordenador vía una red.

En otras modalidades, la divulgación proporciona métodos, composiciones, y kits para el haplotipado y/o genotipado del gen en un individuo. Las composiciones contienen sondas y cebadores de oligonucleótidos diseñados para hibridar específicamente a una o más regiones diana que contienen, o que son adyacente a, un sitio polimórfico. Los métodos y composiciones para establecer el genotipo o haplotipo de un individuo en los sitios polimórficos novedosos descritos en este documento son útiles para estudiar el efecto de los polimorfismos en la etiología de enfermedades afectadas por la expresión y función de la proteína, estudiando la eficacia de los fármacos dirigidos, que predicen la susceptibilidad del individuo a las enfermedades afectadas por la expresión y función de la proteína y que predicen la sensibilidad del individuo a fármacos dirigidos del producto génico.

En incluso otra modalidad, la divulgación proporciona un método de identificación de una asociación entre un genotipo o haplotipo y un rasgo. En modalidades preferidas, el rasgo es la susceptibilidad a una enfermedad, severidad de una enfermedad, la presentación de una enfermedad o respuesta a un fármaco. Dichos métodos tienen aplicabilidad en el desarrollo de pruebas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos para todas las aplicaciones farmacogenéticas donde existe el potencial de una asociación entre un genotipo y un resultado de tratamiento incluyendo determinaciones de eficacia, determinaciones de PK y determinaciones de efecto secundario.

La divulgación también proporciona un sistema de ordenador para almacenar y mostrar los datos de polimorfismo determinados por el gen. El sistema de ordenador comprende una unidad de procesamiento de ordenador; una pantalla; y una base de datos que contiene los datos de polimorfismo. Los datos de polimorfismo incluyen los polimorfismos, los genotipos y los haplotipos identificados del gen en una población de referencia. En una modalidad preferida, el sistema de ordenador es capaz de producir una pantalla que muestra los haplotipos organizados de acuerdo con sus relaciones evolutivas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona sondas de SNP, que son útiles en la clasificación de las personas de acuerdo con sus tipos de variación genética. Las sondas de SNP son oligonucleótidos, que pueden discriminar entre los alelos de un ácido nucleico de SNP en ensayos convencionales de discriminación alélica.

Como se utiliza en este documento, un "ácido nucleico de SNP" es una secuencia de ácido nucleico, que comprende un nucleótido que es variable dentro de una secuencia de nucleótido idéntica por otra parte, entre individuos o grupos de individuos, por lo tanto, existiendo como alelos. Dichos ácidos nucleicos de SNP tienen preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos de SNP pueden ser parte de un cromosoma, o pueden ser una copia exacta de una parte de un cromosoma, *por ejemplo*, por amplificación de dicha parte de un cromosoma a través de PCR o mediante la clonación. Los ácidos nucleicos de SNP se denominarán de ahora en adelante simplemente como "SNPs". Las sondas de SNP son oligonucleótidos que son complementarias a un ácido nucleico de SNP.

Como se utiliza en este documento, el término "complementario" significa exactamente complementario a lo largo de la longitud del oligonucleótido en el sentido de la palabra de Watson and Crick.

En ciertas modalidades preferidas, los oligonucleótidos son complementarios a un alelo del ácido nucleico de SNP, pero no a cualquier otro alelo del ácido nucleico de SNP. Los oligonucleótidos de acuerdo con esta modalidad pueden discriminar entre los alelos del ácido nucleico de SNP de varias formas. Por ejemplo, bajo condiciones estrictas de hibridación, un oligonucleótido de longitud apropiada hibridaran con un alelo del ácido nucleico de SNP, pero no a cualquier otro alelo del ácido nucleico de SNP. El oligonucleótido puede ser marcado por un radio marcador o un marcador fluorescente. Como alternativa, un oligonucleótido de longitud apropiada puede ser utilizado como un cebador de PCR, en donde el nucleótido del terminal 3' es complementario a un alelo del ácido nucleico de SNP, pero no a cualquier otro alelo. En esta modalidad, la presencia o la ausencia de la amplificación por PCR determina el haplotipo del ácido nucleico de SNP.

Los fragmentos de ADNc y genómicos comprenden al menos un sitio polimórfico novedoso identificado en este documento y tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos y puede oscilar hasta la longitud completa del gen. Preferiblemente, un fragmento de acuerdo con la presente divulgación tiene entre 100 y 3000 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente entre 200 y 2000 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente entre 500 y 1000 nucleótidos de longitud.

En la descripción de los sitios polimórficos identificados en este documento se hace referencia a la cadena codificante del gen de conveniencia. Sin embargo, como se reconoce por el experto, las moléculas de ácido nucleico que contienen el gen pueden ser moléculas de doble cadena complementarias y por lo tanto referencia a un sitio particular en la cadena codificante se refiere también al sitio correspondiente en la cadena no codificante complementaria. De esta manera, se puede hacer referencia al mismo sitio polimórfico sobre cualquier cadena y un oligonucleótido puede ser diseñado para hibridar específicamente a cualquier cadena en una región diana que contiene el sitio polimórfico. De esta manera, la divulgación también incluye polinucleótidos de cadena sencilla que son complementarios a la cadena codificante de las variantes genómicas descritas en este documento.

En una modalidad preferida, dicho kit además puede comprender un medio para recolectar una muestra de ADN.

En particular, la composición del cebador genotipado puede comprender al menos dos conjuntos de pares de cebador específico del alelo. Preferiblemente, los dos oligonucleótidos genotipados se envasan en recipientes separados.

- 5 Se debe entender que los métodos descritos en este documento generalmente además pueden comprender el uso de un kit. Los métodos de la invención se llevan a cabo *ex-vivo*.

10 El o los efectos de los polimorfismos identificados en este documento sobre la expresión, pueden ser investigados mediante la preparación de células recombinantes y/u organismos, preferiblemente animales recombinantes, que contienen una variante polimórfica del gen. Como se utiliza en este documento, "expresión" incluye pero no se limita a uno o más de los siguientes: transcripción del gen en ARNm precursor; corte y empalme y otro tratamiento del ARNm precursor para producir ARNm maduro; estabilidad del ARNm; traducción del ARNm maduro en la proteína (incluyendo el codón de uso y disponibilidad de ARNt); y glicosilación y/o otras modificaciones del producto de traducción, si es necesario para la correcta expresión y función.

15 Para preparar una célula recombinante, el isogen deseado se puede introducir en la célula en un vector de tal manera que el isogen sigue siendo extracromosomal. En dicha situación, el gen será expresado por la célula a partir de la ubicación extracromosomal. En una modalidad preferida, el isogen se introduce en una célula de tal manera que se recombina con el gen endógeno presente en la célula. Dicha recombinación necesita de la aparición de un evento de doble recombinación, lo que da lugar al deseado polimorfismo del gen. Los vectores para la introducción de genes tanto para la recombinación y para mantenimiento extracromosomal se conocen en el oficio, y cualquier vector apropiado o construcción del vector se pueden utilizar en la invención. Los métodos tales como electroporación, bombardeo de partículas, co-precipitación de fosfato de calcio y transducción viral para introducir el ADN en las células se conocen en el oficio; por consiguiente, la elección del método puede estar en la competencia y preferencia del médico experto.

25 Los organismos recombinantes, i.e., animales transgénicos, que expresan un gen con variante se preparan utilizando procedimientos estándar conocidos en el oficio. Preferiblemente, una construcción que comprende el gen con variante se introduce en un animal no-humano o un progenitor del animal en un estado embrionario, i.e., la etapa de una célula, o en general no más tarde de aproximadamente la etapa de ocho células. Los animales transgénicos portadores de las construcciones se pueden hacer por varios métodos conocidos por aquellos que tienen habilidad en el oficio. Un método involucra la transfección en el embrión de un retrovirus construido para contener uno o más elementos aislantes, un gen o genes de interés, y otros componentes conocidos por aquellos de habilidad en el oficio para proporcionar un vector versátil completo que hospeda el o los genes aislados como un transgen, *ver por ejemplo*, U.S. Pat. No. 5,610,053. Otro método involucra directamente la inyección de un transgen en el embrión. Un tercer método involucra el uso de células madre embrionarias.

35 Ejemplos de animales, en los que los isogenes se pueden introducir incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, otros roedores, y primates no humanos (ver "The Introduction of Foreign Genes into Mice" y las referencias citadas en este, En: Recombinant ADN, Eds. J .D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, & M. Zoller; W.H. Freeman and Company, New York, pages 254-272). Los animales transgénicos estables que expresan un isogen humano y que produce una proteína humana pueden ser utilizados como modelos biológicos para estudiar enfermedades relacionadas con la actividad y/o expresión anormal, y para seleccionar y ensayar varios fármacos candidatos, compuestos, y regímenes de tratamiento para reducir los síntomas o efectos de estas enfermedades.

40 En la práctica la presente invención, muchas técnicas convencionales en biología molecular, microbiología y ADN recombinante se utilizan. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, *por ejemplo*, "Current Protocols in Molecular Biology", Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); "ADN Cloning: A Practical Approach", Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); "Oligonucleotide Synthesis", Gait, Ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization", Hames & Higgins, Eds. (1985); "Transcription and Translation", Hames & Higgins, Eds. (1984); "Animal Cell Culture", Freshney, Ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes", IRL Press (1986); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning"; the series, Methods in Enzymol., Academic Press, Inc. (1984); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells", Miller and Calos, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1987); and Methods in Enzymology, Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectivamente.

55 Los niveles de control estándar del producto de expresión del gen, lo que determina en los diferentes grupos control, luego se debería comparar con el nivel medido de un producto de expresión del gen en un paciente dado. Este producto de expresión del gen podría ser el ARNm característico asociado con ese grupo de genotipo particular o el producto de expresión del gen del polipéptido de ese grupo de genotipo. El paciente luego podría ser clasificado o asignado a un grupo de genotipo particular basándose en la similitud, los niveles medidos se compararon con los niveles de control para un grupo dado.

Como alguien de habilidad en el oficio entenderá, habrá un cierto grado de incertidumbre involucrado en hacer esta determinación. Por lo tanto, las desviaciones estándar de los niveles del grupo control debería ser utilizado para

hacer una determinación probabilística y los métodos de esta divulgación debería ser aplicable sobre un amplio rango de probabilidad basado en las determinaciones del grupo de genotipo. De esta manera, por ejemplo y no a modo de limitación, en una modalidad, si el nivel medido del producto de expresión del gen cae dentro de 2.5 desviaciones estándar de la media de cualquiera de los grupos control, entonces que individuo puede ser asignado a ese grupo de genotipo. En otra modalidad, si el nivel medido del producto de expresión del gen cae dentro de 2.0 desviaciones estándar de la media de cualquiera de los grupos control, entonces ese individuo puede ser asignado a aquel grupo de genotipo. En incluso otra modalidad, si el nivel medido del producto de expresión del gen cae dentro de 1.5 desviaciones estándar de la media de cualquiera de los grupos control entonces ese individuo puede ser asignado a aquel grupo de genotipo. En incluso otra modalidad, si el nivel medido del producto de expresión del gen es 1.0 o menos desviaciones estándar de la media de cualquiera de los niveles de los grupos de control entonces ese individuo puede ser asignado a aquel grupo de genotipo.

De esta manera, este proceso permitirá la determinación, con varios grados de probabilidad, a qué grupo un paciente específico debería ser colocado y tal asignación a un grupo de genotipo entonces debería determinar la categoría de riesgo en el que el individuo debería ser colocado.

Los métodos para detectar y medir los niveles de ARNm y los niveles de productos de expresión del gen del polipéptido son bien conocidos en el oficio e incluyen el uso de métodos de detección de microarreglos de nucleótidos y polipéptidos que involucran espectrómetros de masas y/o detección de anticuerpos y técnicas de cuantificación. Ver también, Human Molecular Genetics, 2nd Edition. Tom Strachan & Andrew, Read (John Wiley and Sons, Inc. Publication, NY, 1999).

Adicionalmente, la detección de la concentración del producto de expresión (proteína) del polipéptido del gen en fluidos corporales o tejidos pueden ser utilizados para determinar la presencia o ausencia del polimorfismo, y el nivel relativo del producto de expresión del polipéptido puede ser utilizado para determinar si el polimorfismo está presente en un estado homocigoto o heterocigoto y por consiguiente la categoría de riesgo del individuo.

Como se utiliza en este documento, "condición médica" incluye, pero no se limita a, cualquier afección o enfermedad manifestada como uno o más síntomas físicos y/o psicológicos para los cuales el tratamiento es deseable, e incluye enfermedades previamente y recientemente identificadas y otros trastornos.

Como se utiliza en este documento el término "polimorfismo" significaría cualquier variante de secuencia presente en una frecuencia de >1% en una población. La variante de secuencia puede estar presente en una frecuencia significativamente mayor de 1% tal como 5% o 10 % o más. También, el término se puede utilizar para referirse a la variación de secuencia observada en un individuo en un sitio polimórfico. Los polimorfismos incluyen sustituciones de nucleótido, inserciones, deleciones y microsátélites y pueden, pero no es necesario, resultar en diferencias detectables en expresión del gen o función de proteína.

Como se utiliza en este documento, el término "respuesta clínica" significa cualquiera o todas de las siguientes: una medición cuantitativa de la respuesta, no respuesta y respuesta adversa, *i.e.*, efectos secundarios.

Como se utiliza en este documento el término "alelo" significaría una forma particular de una secuencia de gen o de ADN en una ubicación cromosomal específica (locus).

Como se utiliza en este documento, el término "genotipo" significaría una secuencia 5' a 3' sin fases de par de nucleótidos(s) encontrados en uno o más sitios polimórficos en un locus sobre un par de cromosomas homólogos en un individuo. Como se utiliza en este documento, el genotipo incluye un genotipo completo y/o un sub-genotipo.

Como se utiliza en este documento, el término "polinucleótido" significaría cualquier ARN o ADN, que puede ser ARN o ADN no-modificado o modificado. Los polinucleótidos incluyen, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarios, ARN mono y bicatenarios, y ARN que es mezcla de regiones mono y bicatenarios, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más generalmente, bicatenario o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, polinucleótido se refiere a regiones de triple cadena que comprende ARN o ADN o ambos ARN y ADN. El término polinucleótido también incluye DNAs o RNAs que contienen una o más bases modificadas y ADNs o RNAs con esqueletos modificados para la estabilidad o por otras razones.

Como se utiliza en este documento el término "gen" significaría un segmento de ADN que contiene toda la información para la biosíntesis regulada de un producto de ARN, incluyendo promotores, exones, intrones, y otras regiones no traducidas que controlan la expresión.

Como se utiliza en este documento el término "polipéptido" significaría cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces de péptidos o enlaces de péptidos modificados, *i.e.*, isoesteres de péptidos. El polipéptido se refiere a ambas cadenas cortas, comúnmente denominados como péptidos, glicopeptidos u oligómeros, y a cadenas largas, generalmente denominadas como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados del gen. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas ya sea por procesos naturales, tales como tratamiento pos-traducción, o por técnicas de

modificación química que son bien conocidas en el oficio. Tales modificaciones se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, también como en una literatura de investigación voluminosa.

5 Como se utiliza en este documento, el término "sitio polimórfico" significaría una posición dentro de un locus en el cual al menos dos secuencias alternativas se encuentran en una población, la más frecuente de las cuales tiene una frecuencia de no más del 99%.

Como se utiliza en este documento, el término "par de nucleótidos" significaría los nucleótidos encontrados en un sitio polimórfico en las dos copias de un cromosoma a partir de un individuo.

10 Como se utiliza en este documento, el término "por fases" significa, cuando se aplica a una secuencia de pares de nucleótidos para dos o más sitios polimórficos en un locus, la combinación de nucleótidos presente en aquellos sitios polimórficos sobre una copia única del locus se conoce.

15 Con el fin de deducir una correlación entre respuesta clínica a un tratamiento y un genotipo o haplotipo, es necesario obtener datos en las respuestas clínicas mostradas por una población de individuos que recibieron el tratamiento, de ahora en adelante la "población clínica". Estos datos clínicos se pueden obtener mediante el análisis de los resultados de un ensayo clínico que ya ha sido corrido y/o los datos clínicos se pueden obtener mediante el diseño y llevando a cabo uno o más pruebas clínicas nuevas.

Como se utiliza en este documento, el término "ensayo clínico" significa cualquier estudio de investigación diseñado para recolectar datos clínicos en las respuestas a un tratamiento particular, e incluye, pero no se limita a, pruebas clínicas de Fase I, II y III. Los métodos estándar se utilizan para definir la población de pacientes y para reclutar los sujetos.

20 Como se utiliza en este documento el término "locus" significaría una ubicación de un cromosoma o molécula de ADN correspondiente a un gen o una característica física o fenotípica.

25 El tratamiento terapéutico de interés se administra a cada individuo en la población de ensayo y cada respuesta del individuo al tratamiento se mide utilizando uno o más criterios predeterminados. Se contempla que en muchos casos, la población de ensayo mostrará un rango de respuestas y que el investigador escogerá el número de grupos de respuesta, por ejemplo, baja, media y alta, formada por las diferentes respuestas. Además, el gen para cada individuo en la población de ensayo es genotipada y/o haplotipada, que se puede hacer antes o después de administrar el tratamiento.

30 *La Detección de Ácidos Nucleicos y Proteínas como Marcadores.* En una modalidad particular, el nivel de ARNm correspondiente al marcador se puede determinar tanto por formatos *in situ* y por *in vitro* en una muestra biológica utilizando métodos conocidos en el oficio. El término "muestra biológica" tiene la intención de incluir tejidos, células, fluidos biológicos y aislados de estos, aislado a partir de un sujeto, también como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Muchos métodos de detección de expresión utilizan ARN aislado. Para métodos *in vitro*, cualquier técnica de aislamiento de ARN que no se selecciona contra el aislamiento de ARNm, se puede utilizar para la purificación de ARN a partir de las células. Ver, *por ejemplo*, Ausubel et al., Ed., Curr. Prot. Mol. Biol., John Wiley & Sons, NY (1987-1999). Adicionalmente, grandes números de muestras de tejido fácilmente se pueden procesar utilizando técnicas bien-conocidas por aquellos de habilidad en el oficio, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de única etapa de U.S. Pat. No. 4,843,155.

35 El ARNm aislado puede ser utilizado en los ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis Southern o Northern, análisis de PCR y arreglos de sondas. Un método de diagnóstico preferido para la detección de niveles de ARNm involucra el contacto del ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que pueden hibridizar al ARNm codificado por el gen que se detecta. La sonda del ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción de este, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridizar específicamente bajo condiciones estrictas a un ARNm o ADN genómico codificando un marcador de la presente divulgación. Otras pruebas apropiadas para utilizar en los ensayos de diagnóstico de la divulgación se describen en este documento. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el marcador en cuestión se está expresando.

40 En un formato, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, mediante la ejecución del ARNm aislado sobre un gel de agarosa y la transferencia del ARNm a partir del gel con una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alterno, la(s) sonda(s) se inmovilizan sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en un arreglo de chips de gen Affymetrix. Un experto puede fácilmente adaptar los métodos de detección de ARN conocidos para utilizar en la detección del nivel de ARNm codificado por los marcadores de la presente divulgación.

45 Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm en una muestra involucra el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, por RT-PCR (la modalidad experimental enunciada en Mullis, U.S. Pat. No. 4,683,202 (1987); reacción en cadena de la ligasa, Barany (1991), *supra*; replicación de secuencia auto sostenida, Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, pp. 1874-1878 (1990); sistema de amplificación transcripcional, Kwok et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp. 1173-1177 (1989); Q-Beta Replicase, Lizardi et al., Biol. Technology, Vol. 6, p. 1197 (1988); replicación circular continua, U.S. Pat. No. 5,854,033 (1988); o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas, utilizando técnicas bien conocidas por aquellos de habilidad en el oficio. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas del ácido nucleico, si tales moléculas están presentes en muy bajos números. Como se utiliza en este documento, los cebadores de amplificación se definen por ser un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridizar en las regiones 5' o 3' de un gen (más y menos cepas, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta en el medio. En general, los cebadores de amplificación tienen de aproximadamente 10-30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50-200 nucleótidos de longitud. Bajo condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para métodos *in situ*, ARNm no necesita que sea aislado de las células antes de la detección. En dichos métodos, una célula o muestra de tejido se prepara/procesa utilizando conocidos métodos histológicos. La muestra luego se inmoviliza sobre un soporte, generalmente una lámina de vidrio, y luego se pone en contacto con una sonda que puede hibridizar al ARNm que codifica el marcador.

Como una alternativa para hacer determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto del marcador, las determinaciones se pueden basar en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizan por la corrección del nivel de expresión absoluto de un marcador mediante la comparación de su expresión a la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen constitutivo que se expresa constitutivamente. Los genes apropiados para la normalización incluyen genes constitutivos, tales como el gen de actina o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de paciente, con otra muestra o entre muestras de diferentes fuentes.

Como alternativa, el nivel de expresión se puede proporcionar como un nivel de expresión relativo. Para determinar un nivel de expresión relativo de un marcador, el nivel de expresión del marcador se determina para 10 o más muestras de muestras biológicas normales versus de la enfermedad, preferiblemente 50 o más muestras, antes de la determinación del nivel de expresión de la muestra en cuestión. El nivel de expresión medio de cada uno de los genes ensayados en el gran número de muestras se determina y este se utiliza como un nivel de expresión de línea base del marcador. El nivel de expresión del marcador determinado para la muestra de prueba (nivel de expresión absoluto) luego se divide por valor medio de expresión obtenido para ese marcador. Este proporciona un nivel de expresión relativo.

Preferiblemente, las muestras utilizadas en la determinación de la línea base serán de pacientes que no tienen el polimorfismo. La elección de la fuente de células es dependiente del uso del nivel de expresión relativo. Utilizando la expresión encontrada en tejidos normales como una puntuación de la expresión media ayuda en la validación si el marcador ensayado es específico (versus células normales). Además, como más datos se acumulan, el valor medio de expresión se puede revisar, proporcionando los valores de expresión relativos mejorados basándose en los datos acumulados.

Detección de los Polipéptidos. En otra modalidad de la presente divulgación, un polipéptido correspondiente a un marcador se detecta. Un agente preferido para detectar un polipéptido es un anticuerpo capaz de unir un polipéptido correspondiente a un marcador, preferiblemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Un anticuerpo intacto, o un fragmento de este, *por ejemplo*, Fab o F(ab')₂ pueden ser utilizados. El término "marcado", con los que se refiere a la sonda o anticuerpo, tiene la intención de abarcar el etiquetado directo de la sonda o el anticuerpo por acoplamiento, i.e., enlace físicamente, una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, también como etiquetado indirecto de la sonda o el anticuerpo por la reactividad con otro reactivo que se marca directamente. Ejemplos de etiquetado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo en primer lugar utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y etiquetado final de una sonda de ADN con biotina de tal manera que esta pueda ser detectada con estreptavidina marcada fluorescentemente.

Las proteínas a partir de individuos pueden ser aisladas utilizando técnicas que son bien conocidas por aquellos de habilidad en el oficio. Los métodos de aislamiento de proteína empleados pueden, por ejemplo, ser tales como aquellos descritos en Harlow & Lane (1988), *supra*.

Una variedad de formatos se pueden emplear para determinar si una muestra contiene una proteína que se une a un anticuerpo dado. Ejemplos de tales formatos incluyen, pero no se limitan a, EIA; radioinmunoensayo (RIA), análisis Western blot y ELISA. Un experto puede adaptar fácilmente los métodos de detección de proteína/anticuerpo conocidos para utilizar en la determinación si las células expresan un marcador y la concentración relativa de ese producto de expresión del polipéptido específico en sangre u otros tejidos corporales.

En un formato, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, se pueden utilizar en métodos, tales como técnicas de Western blots o inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, es generalmente preferible inmovilizar cualquiera el anticuerpo o las proteínas sobre un soporte sólido. Los soportes o portadores de fase sólida apropiados incluyen cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Los soportes o

portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextran, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita.

Un experto en el oficio conocerá muchos otros portadores apropiados para la unión del anticuerpo o el antígeno, y será capaz de adaptar dicho soporte. Por ejemplo, la proteína aislada a partir de las células de pacientes se puede correr sobre una electroforesis en gel de poliacrilamida y se inmoviliza sobre un soporte de fase sólida, tales como nitrocelulosa. El soporte luego se puede lavar con soluciones reguladoras apropiadas seguido por el tratamiento con el anticuerpo marcado de forma detectable. El soporte de fase sólida luego se puede lavar con la solución reguladora una segunda vez para retirar el anticuerpo sin unir. La cantidad de marcador unido en el soporte sólido luego puede ser detectada por medios convencionales y esta medición se traduce en un nivel o concentración de proteína en sangre u otro tejido corporal.

La divulgación también abarca kits para detectar la presencia de un polipéptido o ácido nucleico correspondiente a un marcador en una muestra biológica, por ejemplo, cualquier fluido corporal incluyendo, pero no limitado a, suero, plasma, linfa, fluido quístico, orina, heces, csf, fluido acético o sangre e incluyendo muestras de biopsias de tejido corporal. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o agente marcado capaz de detectar un polipéptido o un ARNm codificando un polipéptido correspondiente a un marcador en una muestra biológica y los medios para determinar la cantidad del polipéptido o ARNm en la muestra, *por ejemplo*, un anticuerpo que une el polipéptido o una sonda de oligonucleótido que se une a ADN o ARNm codificando el polipéptido. Los kits también pueden incluir las instrucciones para interpretar los resultados obtenidos utilizando el kit.

Para los kits basados en el anticuerpo, el kit puede comprender, *por ejemplo*, 1) un primer anticuerpo, por ejemplo, se une a un soporte sólido, que une a un polipéptido correspondiente a un marcador; y, opcionalmente; y opcionalmente 2) un segundo, anticuerpo diferente, que se une a cualquiera el polipéptido o el primer anticuerpo y se conjuga a un marcador detectable.

Para los kits basados en los oligonucleótidos, el kit puede comprender, *por ejemplo*, 1) un oligonucleótido, *por ejemplo*, un oligonucleótido marcado de forma detectable, que hibridiza a una secuencia de ácido nucleico codificando un polipéptido correspondiente a un marcador; o 2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico correspondiente a un marcador.

El kit también puede comprender, *por ejemplo*, un agente regulador, un conservante o una proteína estabilizante. El kit además puede comprender componentes necesarios para detectar el marcador detectable, *por ejemplo*, una enzima o un sustrato. El kit también puede contener una muestra control o una serie de muestras control, que pueden ser ensayados y en comparación con la muestra de prueba. Cada componente del kit se puede revelar dentro de un recipiente individual y todos de los diferentes recipientes pueden estar dentro de un solo paquete, junto con las instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados utilizando el kit.

Kits. Los kits pueden contener un producto escrito encima o en el recipiente del kit. El producto escrito describe como utilizar los reactivos contenidos en el kit para determinar si un paciente experimentará la hepatotoxicidad durante el tratamiento con el fármaco. En varias modalidades, el uso de los reactivos puede estar de acuerdo con los métodos de la invención. En una modalidad, los reactivos son pares de cebadores para realizar el análisis de PCR de polimorfismos genéticos de *IL1A*.

EJEMPLO

ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO CLÍNICO DE HEPATOTOXICIDAD EN LA PRUEBA CLÍNICA

Demografía de los participantes del análisis farmacogenéticos clínicos. De los 139 sujetos reclutados en el ensayo clínico, 83 consistieron a la participación en la porción farmacogenética clínica del ensayo clínico. Esto representa aproximadamente el 60% de la población total que participó en el ensayo clínico. La población del análisis farmacogenético clínico fue representativa del grupo de ensayo clínico en términos de edad, raza y género. Adicionalmente, la tasa de consentimiento fue comparable para cada rama del ensayo (placebo, 50, 100 y 150 mg/día), de tal manera que el análisis farmacogenético clínico no fue predispuesto hacia un grupo de dosificación. Ninguna diferencia estadísticamente significativa fue observada entre la demografía de la población farmacogenética clínica en comparación con la población del ensayo completo.

TABLA 1

Distribución de muestras farmacogenéticas clínicas en comparación con las muestras del ensayo clínico completo

	Muestras CPG	Muestras de ensayo
EDAD (media, años) ^a	58.8	59.3

RAZA^b

<i>Caucásico</i>	(70) 84%	(117) 84%
<i>Negro</i>	(5) 6%	(9) 6.4%
<i>Oriental</i>	(1) 1.2%	(2) 1.4%
<i>Hispano</i>	(7) 8.4%	(9) 7%
<i>Otro</i>	(0) 0%	(2) 1.4%

GÉNERO^c

<i>Masculino</i>	(50) 60% (88) 63%
<i>Femenino</i>	(33) 40% (51) 37%

DOSIFICACIÓN^d

<i>0 mg/día</i>	(23) 28% (34) 24%
<i>50 mg/día</i>	(20) 24% (32) 23%
<i>100 mg/día</i>	(20) 24% (37) 27%
<i>150 mg/día</i>	(20) 24% (36) 26%

Hepatotoxicidad^e

<i>Si</i>	(6) 7% (9) 6%
<i>No</i>	(77)93% (130)94%

^ap<0.7748 (ANOVA)

^bp<0.9112 (Exacta de Fisher)

^cp<0.6698 (Exacta de Fisher)

^dp<0.9342 (Exacta de Fisher)

^ep<1.000 (Exacta de Fisher)

Las muestras de sangre a partir de cada paciente fueron recolectadas en sitios de ensayo individual y se envían a Covance (Geneva, Switzerland), donde el ADN genómico fue extraído utilizando el Kit de Aislamiento de ADN PUREGENE™ (D-50K) (Gentra, Minneapolis, MN).

- 5 *El genotipado.* Un total de 18 locus en siete genes fueron genotipados. Los ensayos de SNP fueron diseñados utilizando información a partir de bases de datos públicas tales como OMIM, SNP Consortium, Locus Link y dbSNP, y la información de Third Wave Technologies, Inc. (TWT, Madison, WI). Ninguno de los locus que no fue polimórfico en esta población de ensayo además no fue analizado. El genotipado se llevó a cabo con 40-60 ng de ADN genómico utilizando el ensayo Invader® desarrollado por Third Wave Technologies de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Lyamichev V et al., Nat Biotechnol 17: 292-6 (1999); Ryan D et al.. Mol Diagn 4: 135-44 9 (1999)

Cada SNP interrogado en este ensayo fue asignado a un identificador farmacogenético clínico (CPG), denominado como el ID locus PG. Ver la TABLA 2, para una lista de todos los SNPs ensayados en este ensayo, junto con sus IDs locus PG y los detalles acerca de la ubicación del polimorfismo en el gen de interés.

TABLA 2

Lista de genes examinados en el análisis farmacocinético clínico

<u>Símbolo del Gen</u>	<u>Nombre del Gen</u>	<u>CPG ID Locus</u>	<u>REF ACC</u>	<u>Alelo 1 Frec.</u>	<u>Alelo 2 Frec.</u>	<u>Posición</u>	<u>Localización</u>
ABCB1	Casete de enlace ATP, sub familia B (MDR/TAP), miembro 1	181	M29445	0.47	0.53	176	Exón 26 ILE1144IL E
ABCB1	Casete de enlace ATP, sub familia B (MDR/TAP), miembro 1	1006	AC005068.1	0.63	0.37	83646	Desconocido
ABCB1	Casete de enlace ATP, sub familia B (MDR/TAP), miembro 1	1045	AC002457.1	0.48	0.52	19981202	Desconocido
CD14	antígeno CD14	1708	U00699	0.56	0.44	312	Promotor
CYP2D6	citocromo P450, sub familia IID (debrisoquina, esparteína, etc., - metabolizante), polipéptido 6	31	M33388	0.86*	0.14*	3465	Intrón
CYP2D6	Citocromo P450, sub familia IID (debrisoquina, esparteína, etc., - metabolizante), polipéptido 6	211	M33388	0.60*	0.40*	4469	Exón 6 ARG269CY S
CYP2D6	Citocromo P450, sub familia IID (debrisoquina, esparteína, etc., - metabolizante), polipéptido 6	212	M33388	0.52	0.48	5799	Exón 9 THR486SE R
CYP2D6	Citocromo P450, sub familia IID (debrisoquina, esparteína, etc., - metabolizante), polipéptido 6	213	M33388	0.83	0.17	1719	Exón 1 PRO34SER
CYP3A4	Citocromo P450, sub familia IIIA (nifedipina oxidasa), polipéptido 4	2325	AF209389	0.84*	0.16*	20338	Intrón 10
IL1	interleuquina 1, alfa	279	X03833	0.72*	0.28*	549	Promotor
IL1A	interleuquina 1, alfa	302	X03833	0.72*	0.28*	6282	Exón 5
IL1A+	interleuquina 1, alfa	303	X03833	1.00	0.00	4282	Exón 4
NR1I2	Receptor nuclear sub familia 1, grupo I, miembro 2	2641	AC069444	0.62*	0.38*	42813	Promotor
NR1I2	Receptor nuclear sub familia 1, grupo I, miembro 2	2642	AF061056	0.60	0.40	252	Intrón
NR1I2	Receptor nuclear sub familia 1, grupo I, miembro 2	2643	AF061056	0.80	0.20	11156	3' UTR
ORM1	orosomucoide 1 (alfa-1-ácido glicoproteína)	1831	NT_031830	0.57*	0.43*	191	Exón 1
ORM1	orosomucoide I (alfa-1-ácido glicoproteína)	1832	NT_031830	0.97	0.03	2077	Exón 5
ORM1	orosomucoide I (alfa-1-ácido glicoproteína)	1833	NT_031830	0.96	0.04	5041	Intrón

*Este SNP no está en equilibrio de Hardy-Weinberg en esta población de pacientes.

+Este locus no es polimórfico en esta población de pacientes y no se utilizó en el análisis.

Los locus en *ABCB1*, *CD14*, *IL1A*, y *ORM1* fueron cuestionados, analizando directamente el ADN genómico utilizando la tecnología de Third Wave Technologies. Debido a la alta homología de la secuencia dentro de la familia de genes *CYP450*, *CYP2D6* fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificada en tres fragmentos antes del ensayo Invader® genotipado para asegurar la especificidad. Las secuencias cebador para cada segmento se enumeran en la TABLA 3 junto con la región del gen abarcada por cada conjunto cebador. Cada amplicón fue generado en una reacción de 25 µl que contiene 20-60 ng de ADN genómico, 0.5 µl de 10 mM dNTPs, 2.5 µl de 10X Solución reguladora de PCR I con 15 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2.5 µl DMSO, 0.5 µl de *CYP2D6*-cebador hacia adelante 20 µM, 0.5 µl de *CYP2D6*-cebador reverso 20 µM, y 1.25 U Taq de ADN polimerasa (Applied Biosystems). 35 ciclos de amplificación fueron llevados a cabo utilizando las siguientes condiciones: 94°C, 30 seg; 65°C, 1 min.; 72°C, 2 min. La amplificación del producto apropiado fue confirmada sobre cinco muestras al azar, por fraccionamiento sobre un gel de agarosa al 1% que contiene bromuro de etidio. Los amplicones fueron diluidos 1:10 en TE (pH 8.0) antes del genotipado.

TABLA 3

Cebadores utilizados para amplificar *CYP2D6*

Región del gen (ID locus PG)	Nombre del Cebador	Secuencia Cebador (5'→3')	Tamaño (bp)
Exones 1 y 2 (31)	2D6L1F1	CTGGGCTGGGAGCAGCCTC (SEQ ID NO:5)	2036
	2D6L1R1	CACTCGCTGGCCTGTTTCATGTC (SEQ ID NO:6)	
Exones 3, 4 y 5 (31 & 211)	2D6L2F	CTGGAATCCGGTGTCTGAAGTGG (SEQ ID NO:7)	1683
	2D6L2R2	CTCGGCCCTGCACTGTTTC (SEQ ID NO:8)	
Exones 7, 8 y 9 (212)	2D6L3F	GAGGCAAGAAGGAGTGTCAGGG (SEQ ID NO:9)	1754
	2D6L3R5B	AGTCCTGTGGTGAGGTGACGAGG (SEQ ID NO:10)	

La PCR para el gen *CYP3A4* se llevó a cabo en una reacción de 25 µl que contiene 15-30 ng de ADN genómico, 0.4 µl de 10 mM dNTPs, 2.5 µl de 10X solución reguladora de PCR I con MgCl₂ 15 mM (Applied Biosystems), 0.75 µl de *CYP3A4*-cebador hacia adelante 20 µM, 0.75 µl de *CYP3A4*-cebador reverso 20 µM, y 0.75 U Taq de ADN polimerasa (Applied Biosystems). 30 ciclos de amplificación fueron llevados a cabo utilizando las siguientes condiciones: 94°C, 30 seg; 58°C, 30 seg; 72°C, 30 seg. Para confirmar que el producto apropiado fue generado, cinco muestras fueron fraccionadas en un gel de agarosa al 1% que contiene bromuro de etidio y el tamaño de fragmento fue visualizado. Las secuencias cebador son de la siguiente manera:

*CYP3A4*Exon10F-(5'-TGGATGGCCACATTCTCG-3'; SEQ ID NO:11), y

*CYP3A4*Exon10R-(5' CTTCTACATAGAGTCAGTG-3'; SEQ ID NO:12). Una dilución 1:20 del producto de PCR en TE (pH 8.0) fue corrida contra ID locus PG 2325 utilizando una placa bplex de 384 pozos para el ADN amplificado.

El análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP) fue utilizado para el genotipado de tres locus polimórficos en el *NR1I2*. Las secuencias de *NR1I2* primero fueron PCR amplificadas en reacciones de 25 µl que contienen 15-30 ng de ADN genómico, 0.4 µl de 10 mM dNTPs, 2.5 µl de 10X Solución reguladora de PCR I con MgCl₂ 15 mM (Applied Biosystems), 0.50 µl de *NR1I2*-cebador hacia adelante 20 µM, 0.50 µl de *NR1I2*-cebador reverso 20 µM, y 0.75 U Taq de ADN polimerasa (Applied Biosystems). Las secuencias para los conjuntos de cebadores utilizadas para cada ensayo se enumeran en la TABLA 4. Treinta y cinco ciclos de amplificación fueron llevados a cabo utilizando las siguientes condiciones: 94°C, 30 seg; 60°C, 30 seg; 72°C, 30 seg. Los amplicones fueron fraccionados en un gel de agarosa al 3%, que contiene bromuro de etidio.

TABLA 4

Análisis RFLP de polimorfismos de *NR1I2*

ID locus PG (Nombre del Ensayo)	Nombre del Cebador	Secuencia Cebador (5'-3')	Endonucleasa Restricción	Tamaño Frag (bp) / nombre del alelo
2642 (PXR- 252)	PXR-252-F	GGACACAGAGTCT GTTCTGG (SEQ ID NO:13)	BSMB1	318/A 204 & 114/G
	PXR-252-R	GAAGATGAAGGA TTCCTCTGGG (SEQ ID NO:14)		
2643 (PXR- 11156)	PXR- 11156-F	GACAAGGCTACGC TGACAATCAG (SEQ ID NO:15)	Ddel	342/C 193 & 149/A
	PXR- 11156-R	GCTTGCGTATGTT TCTATTTCCAC (SEQ ID NO:16)		
2641 (PXR- 24113)	PXR- 24113-F	CGGAGCAAAGAA CTTACCACC (SEQ ID NO:17)	HphI	253/G 195 & 58/A
	PXR- 24113-R	TGCAGGACCAGAG AGCATCAG (SEQ ID NO:18)		

Las enzimas de restricción utilizadas para el análisis RFLP de los productos de PCR se enumeran en la TABLA 4 junto con el tamaño de fragmento que producen y el nombre del alelo resultante. Todas las enzimas de restricción fueron adquiridas de New England Biolabs, Beverly, MA. Las condiciones de reacción fueron de la siguiente manera: (1) las digestiones de BMSB1 fueron llevadas a cabo en una reacción de 20 µl utilizando 2 µl de 10X Solución reguladora 3 (New England Biolabs), 8 µl de ADN amplificado, y 2U de enzima BSMB1. Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 4.5 horas a 55°C; (2) las digestiones de Ddel fueron llevadas a cabo en una reacción de 20 µl utilizando 2 µl de 10X Solución reguladora 3 (New England Biolabs), 8 µl de ADN amplificado, y 4 U de enzima Ddel. Las reacciones fueron incubadas durante 17 horas a 37°C; (3) las digestiones de HphI fueron como las digestiones de Ddel excepto que 10X de Solución reguladora 4 (New England Biolabs) fue utilizada en lugar de 10X de Solución reguladora 3. El ADN digerido fue fraccionado (10 µl) sobre un gel de agarosa al 3% que contiene bromuro de etidio y el tamaño de banda se visualizó.

Análisis Estadístico. El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Exacta de Fisher fueron utilizados para el análisis del efecto del genotipo y la hepatotoxicidad. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el software SAS 8.02. Para corregir las múltiples pruebas, el método de corrección de Bonferroni se llevó a cabo (ver, más adelante).

Hepatotoxicidad y metabolismo de la N-benzoil-estaurosporina. La relación entre la aparición de la hepatotoxicidad en el ensayo clínico y la dosis de N-benzoil-estaurosporina administrada se examinó. El porcentaje de sujetos por grupo de dosis que experimentaron hepatotoxicidad es de la siguiente manera: 3% para 50 mg/día, 8% para 100 mg/día y 14% de aquellos que tomaron 150 mg/día. Mientras que la mayoría de los sujetos que experimentaron toxicidad del hígado, tomaron la dosis más alta de N-benzoil-estaurosporina, la asociación entre la dosis de N-benzoil-estaurosporina y la hepatotoxicidad no es significativa ($p = 0.09$; Exacta de Fisher).

Las evaluaciones farmacocinéticas se realizaron en el ensayo clínico, pero los dos principales metabolitos de la N-benzoilestaurosporina no pudieron ser detectados en la sangre de la mayoría de los sujetos porque estos se unieron fuertemente a la proteína del suero ácido α_1 - glicoproteína (AGP). La AGP es una proteína glicosilada con exceso que se sintetiza en primer lugar en el hígado y funciona como una proteína de respuesta de fase aguda. Hocheppied T et al., Cytokine Growth Factor Rev 14: 25-34 (2003); Israili ZH & Dayton PG, Drug Met Rev 33: 161-235 (2001). Un análisis se realizó para ver si los niveles de AGP se correlacionan con la aparición de la hepatotoxicidad. El nivel máximo de AGP de la visita 3-5 fue utilizado para este análisis, y todos los participantes en el ensayo clínico, no solo los que accedieron al análisis farmacogenético, fueron incluidos. La concentración media máxima de AGP entre aquellos que experimentaron hepatotoxicidad fue 109.7 mg/dl, que fue significativamente superior de 87.8 mg/dl, la concentración media máxima para aquellos que no experimentaron hepatotoxicidad ($p=0.046$, ANOVA).

AGP se codifica por dos genes, *ORM1* y *ORM2*, que están estrechamente vinculados en el cromosoma 9q31-34.1. Webb GC et al., Cytogenet Cell Genet 47: 18-21 (1998). *ORM1* es altamente polimórfico (Yuasa I et al., Hum Genet 99: 393-8 (1997)), y tres SNPs en *ORM1* fueron cuestionados en este ensayo (IDs locus PG1831, 1832 y 1833). No se vio asociación entre los genotipos en los tres locus *ORM1* examinados y los niveles de AGP detectados en el suero. Ver, TABLA 5.

TABLA 5

ORM1SNPs no se asocia con los niveles máximos de AGP.

<u>ID locus PG</u>	<u>AGP Max (valor p, ANOVA)</u>
1831	0.51
1832	0.07
1833	0.95

Adicionalmente, los *ORM1* SNPs cuestionados en este análisis no se asocian con la hepatotoxicidad. Ver, TABLA 6, a continuación. Para examinar posibles asociaciones entre la aparición de la hepatotoxicidad y SNPs en *CYP2D6*, *CYP3A4*, *ABCB1* y *NR1I2* más a fondo, cada enzima del hígado se examinó independientemente. Los valores máximos de alanina aminotransferasa y aspartato transaminasa en suero, registrados en las visitas 3-5, fueron analizados utilizando ANOVAs. No fueron encontrados entre SNPs en los genes que contribuyen al metabolismo y distribución de la N-benzoil-estaurosporina y la elevación máxima de cualquiera la alanina aminotransferasa o la aspartato transaminasa. No se encontró una asociación significativa entre los niveles máximos de la alanina aminotransferasa o la aspartato transaminasa y los polimorfismos *ORM1*.

TABLA 6

Asociación entre hepatotoxicidad, ALT Max y AST Max y 17 SNPs localizados en 6 diferentes genes

Gen	Locus PG ID	<u>Hepatotoxicidad</u> Total (Exacta de Fisher)	ALT Max (valor p; call (valor p; ANOVA ANOVA)	AST Max (valores p;
ABCB1	181	0.59	0.55	0.32
ABCB1	1006	1.00	0.63	0.24
ABCB1	1045	0.50	0.35	0.09
CD14	1708	1.00	0.87	0.90
CYP2D6	31	1.00	0.99	0.63

CYP2D6	211	1.00	0.85	0.66
CYP2D6	212	0.46	0.16	0.52
CYP2D6	213	0.22	0.17	0.59
CYP3A4	2325	0.72	0.38	0.49
AL1A	279	0.23	0.37	0.031
IL1A	302	0.29	0.38	0.029
NR1I2	2641	0.82	0.56	0.21
NR1I2	2642	0.84	0.28	0.86
NR1I2	2643	1.00	0.57	0.73
ORM1	1831	0.61	0.72	0.76
ORM1	1832	0.24	0.80	0.82
ORM1	1833	1.00	0.96	0.64

En resumen, los datos en las TABLAS 5 y 6 no proporcionan evidencia de que la hepatotoxicidad observada en el ensayo clínico fue el resultado de la variada exposición a la N-benzoil-estaurosporina.

5 Sin embargo, la N-benzoil-estaurosporina se metaboliza por *CYP3A4* y *CYP2D6*, y es un sustrato de la bomba p-glicoproteína, codificada por *ABCB1*. *CYP3A4* no es muy polimórfico, y las variantes genéticas rara vez cuentan para las diferencias vistas en la función de la proteína. Spurdle AB et al., *Pharmacogenetics* 12: 355-66 (July 2002) y análisis interno. También, la transcripción de *CYP3A4* se regula por el pregnano X receptor, PXR (Goodwin B et al., *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 1-23 (2002)), el cual se codifica por un gen polimórfico llamado *NR1I2*. En consecuencia, los polimorfismos en los siguientes genes que contribuyen al metabolismo de la N-benzoil-estaurosporina fueron examinados: *CYP2D6* (IDs locus PG 31, 211, 212, 213); *CYP3A4* (ID locus PG 2325); *NR1I2* (IDs locus PG 2641, 2642, 2643); y *ABCB1* (IDs locus PG 181, 1006, 1045). No se encontró que la ocurrencia de la hepatotoxicidad en el ensayo clínico se asocie con cualquiera de los polimorfismos cuestionados en estos cuatro genes.

15 *La hepatotoxicidad y los genes asociados con mecanismos de lesión del hígado idiosincráticos.* La hepatotoxicidad observada durante los estados clínicos de desarrollo del fármaco generalmente, se asocia con los niveles de exposición al fármaco. Sin embargo, algunos sujetos pueden experimentar elevaciones de la enzima del hígado porque algo sobre su entorno intrahepático (niveles de citoquinas o enzimas que neutralizan los radicales libres, por ejemplo) promueve la toxicidad del compuesto. Estos mecanismos de toxicidad del hígado se denominan como "idiosincráticos". Encontrar una asociación entre los polimorfismos genéticos y los mecanismos idiosincráticos portadores de hepatotoxicidad no es muy probable porque la hepatotoxicidad es un evento relativamente raro que puede ser influenciado por múltiples vías de señalización.

25 *Hepatotoxicidad y Genes asociados con la respuesta inflamatoria.* Los polimorfismos en dos genes que podrían contribuir a las respuestas de fase aguda en el hígado, *CD14* e *IL1A*, fueron examinados en este ensayo. *CD14* regula la liberación de citoquinas inflamatorias a partir de células Kuppfer (Jarvelainen HA et al., *Hepatology* 33: 1148-53 (2001)) y *IL1A* es un importante mediador de respuestas a agentes que dañan el tejido. Ramadori G & Christ B, *Semin Liver Dis* 19: 141-55 (1999). Dos locus polimórficos en *IL1A* fueron cuestionados en este ensayo (IDs locus PG 279 y 302) y tres locus fueron investigados en *CD14* (IDs locus PG 2641, 2642 y 2643). No se encontraron asociaciones entre los locus estudiados y la llamada, hepatotoxicidad completa, en el ensayo clínico. Ver, TABLA 5.

30 A continuación, los SNPs en *IL1A* y *CD14* fueron analizados para su posible asociación con elevaciones en cada enzima del hígado independientemente. El valor máximo en suero de la aspartato transaminasa o la alanina aminotransferasa registrado entre las visitas 3 y 5 fue asociado con los genotipos en los locus de interés en *IL1A* y *CD14* utilizando un ANOVA. No se encontraron asociaciones entre la alanina aminotransferasa y los SNPs en *IL1A* o *CD14*.

35 Sin embargo, ambos SNPs de *IL1A*, IDs locus PG 279 y 302, se asociaron con el valor máximo en suero de la aspartato transaminasa registrado en las visitas 3, 4, o 5 ($p = 0.031$ y 0.029 , respectivamente). ID locus PG 279, una transición C→T en el promotor de *IL1A* (posición 549 en número de acceso GenBank X03833), ha sido

reportada por estar en desequilibrio de ligamiento con ID locus PG 302. Jovenne P et al., Eur Cytokine Netw 10: 33-6 (1999). Nuestros resultados soportan el fuerte ligamiento entre estos dos locus (99.99%). ID locus PG 302 es un cambio de base G→T en el exón 5 (posición 6282 en el número de acceso GenBank X03833) que da lugar a una sustitución de aminoácido de alanina a serina. Para cada uno de estos SNPs, el genotipo TT es raro; solo dos individuos son TT para el ID locus PG 279 y 302. Por esta razón, se analizaron los individuos homocigotos TT junto con los heterocigotos GT (ID locus PG 302) o CT (ID locus PG 279). De esta manera, para ID locus PG 279, los sujetos con un genotipo CC, fueron comparados con sujetos con un T en ese locus (ya sea CT o TT). Para ID locus PG 279, el valor medio máximo en suero de la aspartato transaminasa para individuos CC fue 37.1 U/L, mientras que los individuos T (CT y TT) tuvieron un valor medio máximo en suero de la aspartato transaminasa significativamente inferior de 23.1 U/L ($p=0.0089$, ANOVA). Del mismo modo, para ID locus PG 302, los sujetos que eran GG se compararon con Ts (sujetos que eran tanto GT como TT). Cuando los datos se agruparon utilizando esta tecnología, una asociación más fuerte se observó entre el genotipo en cada locus y la aparición de la hepatotoxicidad. Para ID locus PG 302, los individuos GG tuvieron un nivel medio máximo en suero de la aspartato transaminasa de 36.6 U/L, que fue significativamente superior de 22.9 U/L, el nivel medio máximo en suero de la aspartato transaminasa para individuos T (CT y TT) ($p= 0.0097$, ANOVA). Los diagramas de dispersión en la FIG. 1 y FIG. 2 muestran que los sujetos con los valores máximos más altos en suero de la aspartato transaminasa mientras que toman N-benzoil-estaurosporina fueron CC en ID locus PG 279 y GG en ID locus PG 302.

Debido a que múltiples SNPs fueron probados por su asociación con la hepatotoxicidad en el ensayo clínico, un factor de corrección se aplicó a los resultados. El método de corrección de Bonferroni necesita que los valores p se ajusten por un factor de 17 (el número de SNPs polimórficos cuestionados en este ensayo).

$$\text{Bonferroni} = \frac{0.05}{\eta} = \frac{0.05}{17} = 0.0029$$

Donde η = *PCK412* número de pruebas. Utilizando este factor de corrección, ningún SNP con una asociación con $p \geq 0.0029$ es significativa. Las asociaciones entre los polimorfismos *IL1A* y los niveles en suero de la aspartato transaminasa tuvieron valores p de 0.0089 y 0.0097.

En resumen, los sujetos que son CC en el locus PG 279 y GG en el locus PG 302 dentro del gen *IL1A* son más propensos a experimentar elevados niveles en suero de la aspartato transaminasa después de tomar la N-benzoil-estaurosporina. Mientras que la media máxima de la aspartato transaminasa para sujetos CC no fue sobre el límite superior normal, un diagrama de dispersión de los datos demuestra que todos menos uno de los sujetos que tuvieron niveles en suero de la aspartato transaminasa sobre el límite superior normal fueron CC para ID locus PG 279 (FIG. 1) y GG para ID locus PG 302 (FIG. 2).

La toxicidad del hígado inducida por el fármaco generalmente se caracteriza por la inflamación. Jaeschke H et al., Toxicol Sci 65: 166-76 (2002). La familia de proteínas interleuquina 1, se conoce que tiene actividades biológicas múltiples y son reguladores clave de la respuesta a la infección y la lesión. Al igual otras citoquinas proinflamatorias, *IL1A* induce la actividad de NF- κ B, lo que aumenta la transcripción de genes inducibles por la citoquina. Los efectos de *IL1A* se median por la inducción de otras citoquinas, incluyendo factor que estimula la colonia de granulocitos, factor alfa de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 6, interleuquina 8, y factor de crecimiento derivado de plaquetas. Paul WE, Fundamental Immunology, Fourth Edition (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1999). Sobre todo en modelos en ratón, *IL1A* se ha mostrado para actuar de forma sinérgica con TNF para inducir la lesión en el hígado. Nagakawa J et al., Immunopharmacol Immunotoxicol 13: 485-98 (1991).

Además de ser asociados con la hepatotoxicidad, la familia de proteínas de la interleuquina 1, ha sido implicada en la inducción de la secreción de la insulina y la estimulación de apoptosis en células pancreáticas®. Paul WE, Fundamental Immunology, Fourth Edition (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1999). Esto es relevante para este ensayo dado que los participantes del ensayo clínico tuvieron diabetes del tipo I o tipo II. La producción de *IL1* mediante las células inflamatorias locales durante el proceso autoinmune en diabetes mellitus dependiente de la insulina (diabetes tipo I) puede contribuir a la destrucción de células pancreáticas®. Mandrup-Poulsen T et al., Cytokine 5: 185-81 (1993). Se ha demostrado que los miembros de la familia Interleuquina 1 inducen la producción de óxido nítrico (NO) por islotes pancreáticos, y reporta en el soporte de literatura un papel de NO en el desarrollo de la diabetes. Adicionalmente, el tratamiento de la línea similar a la célula pancreática® RIN-5AH con *IL1A* dando lugar a la apoptosis y necrosis dentro de 4 horas después del tratamiento. Vassiliadis S et al., Mediators Inflamm 8: 85-91 (1999). Curiosamente, *IL1A* se mostró que induce la expresión de PKC en células RIN-5AH por el 30%. Por lo tanto, además de que influye la hepatotoxicidad, *IL1A* puede influir la eficacia de la N-benzoil-estaurosporina en pacientes diabéticos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

McCullough, Karen

Wolfgang, Curt

<120> USO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS PARA PREDECIR HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL FÁRMACO

5 <130> DV/4-33390A

<150> 60/508,972

<151> 2003-10-06

<160> 18

<170> FastSEQ para la versión windows 4.0

10 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> variación

<222> (1)...(20)

<223> ID locus PG 279; interleuquina 1, gen alfa (X03833) posiciones 541 - 560; variante "C" en la posición 549

<221> variación

<222> (9)...(0)

20 <223> C

<400> 1

aggcaacacc attgaaggct 20

<210> 2

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variación

<222> (1)...(20)

30 <223> ID locus PG 279; interleuquina 1, gen alfa (X03833) posiciones 541 - 560; variante "T" en la posición 549

<221> variación

<222> (9)...(0)

<223> T

<400> 2
aggcaacatc attgaaggct 20
<210> 3
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> variación
<222> (1)...(20)
10 <223> ID locus PG 302; interleuquina 1, gen alfa (X03833) posiciones 6270 - 6290; variante "G" en la posición 6282
<221> variación
<222> (12)...(0)
<223> G
<400> 3
15 agcctaggtc agcaccttt 20
<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
20 <220>
<221> variación
<222> (1)...(20)
<223> ID locus PG 302; interleuquina 1, gen alfa (X03833) posiciones 6270 - 6290; variante "T" en la posición 6282
<221> variación
25 <222> (12) ... (0)
<223> T
<400> 4
agcctaggtc atcaccttt 20
<210> 5
30 <211> 19
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<221> cebador_enlace

<222> (1)...(19)

<223> cebador PCR 2D6L1F1

5 <400> 5

ctgggctggg agcagcctc 19

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> cebador_enlace

<222> (1)...(23)

<223> cebador PCR 2D6L1R1

15 <400> 6

cactcgctgg cctgttcat gtc 23

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> cebador_enlace

<222> (1)...(22)

<223> cebador PCR 2D6L2F

25 <400> 7

ctggaatccg gtgtcgaagt gg 22

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> cebador_enlace

<222> (1)...(20)
 <223> cebador PCR 2D6L2R2
 <400> 8
 ctcggcccct gcactgttc 20

5 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>

10 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(22)
 <223> cebador PCR 2D6L3F
 <400> 9
 gaggaagaa ggagtgcag gg 22

15 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>

20 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(23)
 <223> cebador PCR 2D6L3R5B
 <400> 10
 agtcctgtgg tgagtgacg agg 23

25 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>

30 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(19)
 <223> cebador PCR CYP3A4Exon10F

<400> 11
 tggatggccc acattctcg 19
 <210> 12
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(20)
 10 <223> cebador PCR CYP3A4Exon10R
 <400> 12
 cttcctacat agagtcagtg 20
 <210> 13
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(21)
 20 <223> cebador PCR PXR 252 F
 <400> 13
 ggacacagag tctgttcctg g 21
 <210> 14
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(22)
 30 <223> cebador PCR PXR 252 R
 <400> 14
 gaagatgaag gattcctctg gg 22

<210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(23)
 <223> PXR 11156 F
 <400> 15
 10 gacaaggcta cgctgacaat cag 23
 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <221> cebador_enlace <222> (1)...(24)
 <223> PXR 11156 R
 <400> 16
 gcttgcgtat gtttctatt ccac 24
 20 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <221> cebador_enlace
 <222> (1)...(21)
 <223> PXR 24113 F
 <400> 17
 cggagcaaag aactaccac c 21
 30 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> cebador_enlace

<222> (1) ... (21)

5 <223> PXR 24113 R

<400> 18

tcgaggacca gagagcatca g 21

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

5 **1.** Uso de la N-benzoil-estaurosporina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de retinopatía diabética con hepatotoxicidad reducida en una población de pacientes seleccionada, en donde la población de pacientes se selecciona en función del genotipo de los pacientes en un locus genético *IL1A* predictivo de la hepatotoxicidad, en donde el locus genético *IL1A* predictivo del genotipo de hepatotoxicidad es:

(i) un genotipo homocigoto C, en la posición 549 en el promotor del gen *IL1A*, según se define por el número de referencia GenBank X03833, y

(ii) un genotipo homocigoto G, en la posición 6282 en el exón 5 del gen *IL1A*, según se define por el número de referencia GenBank X03833.

10 **2.** Un método para predecir la hepatotoxicidad inducida por el fármaco N-benzoil-estaurosporina en un sujeto, que comprende la etapa de: determinación *in vitro* del genotipo de un sujeto en el locus genético *IL1A* en,

(i) la posición 549 en el promotor del gen *IL1A*, según se define por el número de referencia GenBank X03833, y,

(ii) la posición 6282 en el exón 5 del gen *IL1A*, según se define por el número de referencia GenBank X03833

15 en donde un genotipo homocigoto C, en la posición 549 en el promotor del gen *IL1A*, según se define por el número de referencia GenBank X03833, y un genotipo homocigoto G, en la posición 6282 en el exón 5 del gen *IL1A*, según se define por el número de referencia GenBank X03833, es predictivo de un riesgo de hepatotoxicidad inducida por el fármaco N-benzoil-estaurosporina.

20

25

30

35

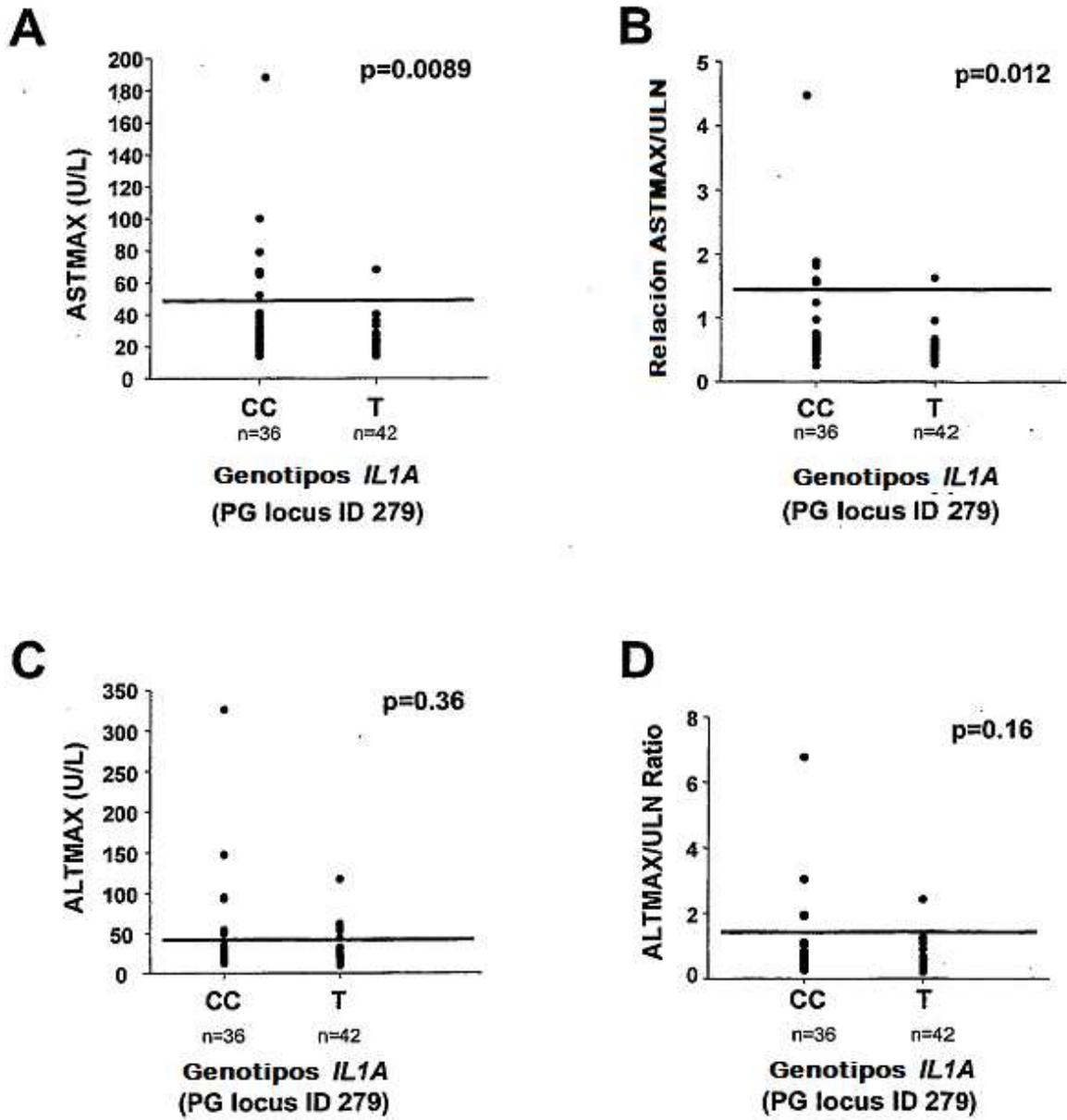


FIG. 1: Niveles Máximos AST/ALT v *IL1A* (PG locus ID 279)

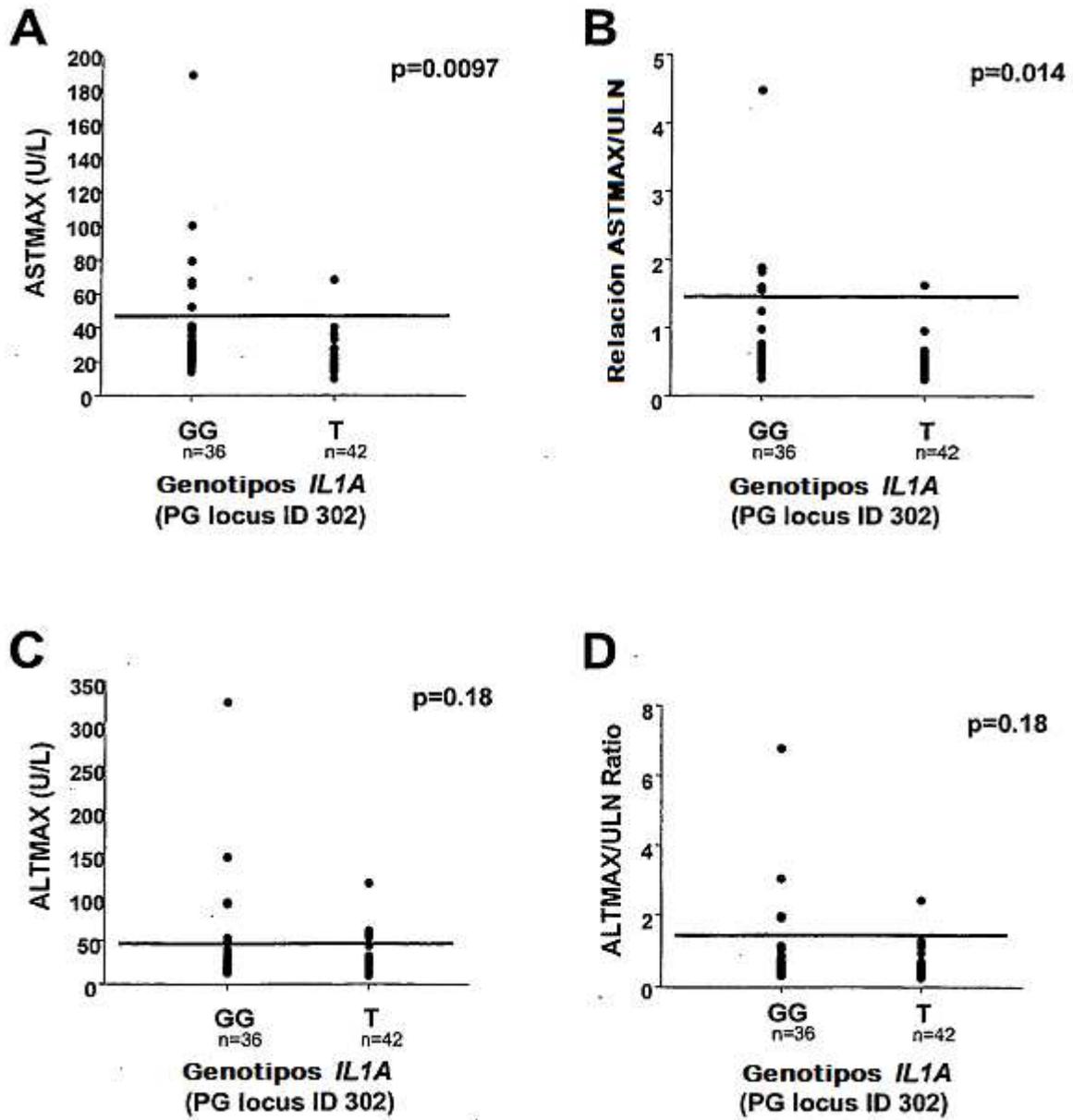


FIG. 2: Niveles Máximos AST/ALT v *IL1A* (PG locus ID 302)

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patentes citadas en la descripción

- US 6214819 B [0005]
 - US 20030119812 A [0005] [0018]
 - US 20030125343 A [0005] [0018]
 - US 20030153551 A [0005] [0018]
- 10
- US 5093330 A [0014]
 - EP 730663 A [0017]
 - EP 717113 A [0017]
 - US 9702102 W [0017]
 - US 5744460 A [0018]
- 15
- US 5827846 A [0018]
 - US 6018042 A [0018]
 - US 6153599 A [0018]
 - US 6214819 A [0018]
 - US 6300076 B1 [0026]
- 20
- US 6297018 B1 [0026]
 - US 6300063 B1 [0026]
 - US 5846717 A [0027]
 - US 6001567 A [0027]
 - WO 9820020 A [0029]
- 25
- WO 9820019 A [0029]
 - US 4965188 A [0040]
 - WO 9001069 A [0040]
 - US 5130238 A [0041]
 - EP 329822 A [0041]
- 30
- US 5169766 A [0041]
 - WO 8906700 A [0041]
 - WO 9511995 A [0044]
 - WO 9215712 A [0046]

- US 5679524 A [0046]
- WO 9102087 A [0046]
- WO 9009455 A [0046]
- WO 9517676 A [0046]
- 5 • US 5302509 A [0046]
- US 5945283 A [0046]
- US 5605798 A [0046]
- WO 9322456 A [0046]
- WO 8910414 A [0046]
- 10 • US 5866404 A [0047] [0048]
- US 5610053 A [0082]
- US 4843155 A [0105]
- US 4683202 A, Mullis [0108]
- US 1987 A [0108]
- 15 • US 5854033 A [0108]
- US 1988 A [0108]

Literatura no-patente citada en la descripción

- Way KJ et al. *Diabetic Medicine*, 2001, vol. 18, 945-59 [0002]
- Koya D ; King GL. *Diabetes*, 1998, vol. 47, 859-866 [0003]
- 20 • Ishii H et al. *J Mol Med*, 1998, vol. 76, 21-31 [0003]
- Way KJ et al. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, vol. 21, 181-7 [0003]
- Dunlop ME ; Larkins RG. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, vol. 132, 467-73 [0003]
- Aiello LP et al. *Diabetes*, 1997, vol. 46, 1473-80 [0004]
- PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Freeman Press, 1992 [0017]
- 25 • PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. Academic Press, 1990 [0017]
- Kan ; Dozy. *Lancet*, 1978, vol. II, 910-912 [0017]
- Wallace et al. *Nucl. Acids Res.*, 1978, vol. 6, 3543-3557 [0017]
- Saiki et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, vol. 86, 6230-6234 [0017]
- Maskos ; Southern. *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2269-2270 [0017]
- 30 • Newton et al. *Nucl. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 2503-2516 [0017]
- Faham ; Cox. *Genome Res.*, 1995, vol. 5, 474-482 [0017]
- Wagner et al. *Nucl. Acids Res.*, 1995, vol. 23, 3944-3948 [0017]

- Fisher ; Lerman. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 1579-1583 [0017]
- Orita et al. *Genomics*, 1983, vol. 5, 874-879 [0017]
- Myers et al. *Science*, 1985, vol. 230, 1242 [0017]
- Cotton et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 8Z, 4397-4401 [0017]
- 5 • Youil et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995, vol. 92, 87-91 [0017]
- Syvanen et al. *Genomics*, 1990, vol. 8, 684-692 [0017]
- Nikiforov et al. *Nucl. Acids Res.*, 1994, vol. 22, 4167-4175 [0017]
- Landegren et al. *Science*, vol. 241, 1077 [0017]
- Barrany. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, vol. 88, 189-193 [0017]
- 10 • Abravaya et al. *Nucl. Acids Res.*, 1995, vol. 23, 675-682 [0017]
- Orum et al. *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 5332-5356 [0017]
- Thiede et al. *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24, 983-984 [0017]
- Sambrook J et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 2000 [0017]
- Wang et al. *Science*, 1998, vol. 280, 1077-1082 [0019]
- 15 • Nowotny P. *Current Opinions in Neurobiology*, 2001, vol. 11, 637-641 [0022]
- Shi MM. *Clin Chem*, 2001, vol. 47, 164-172 [0025] [0026]
- Cox et al. *Hum Mutat*, 2001, vol. 17, 141-150 [0025]
- Chan X et al. *Genome Res*, 1999, vol. 9, 492-499 [0026]
- Ahmadiian A et al. *Anal Biochem*, 2000, vol. 280, 103-110 [0026]
- 20 • Ryan D et al. *Molecular Diagnosis*, 1999, vol. 4 (2), 135-144 [0027]
- Lyamichev V et al. *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 292-296 [0027]
- Stevens JC. *Mol Diag*, 1999, vol. 4, 309-317 [0039]
- Barany et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 189-193 [0040]
- Landegren et al. *Science*, 1988, vol. 241, 1077-1080 [0040]
- 25 • Walker et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 392-396 [0041]
- Winter et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, vol. 82, 7575 [0045]
- Meyers et al. *Science*, 1985, vol. 230, 1242 [0045]
- Modrich P. *Ann Rev Genet*, 1991, vol. 25, 229-253 [0045]
- Orita et al. *Genomics*, 1989, vol. 5, 874-879 [0045]
- 30 • Humphries et al. *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*. 1996, 321-340 [0045]
- Wartell et al. *Nucl Acids Res*, 1990, vol. 18, 2699-2706 [0045]
- Sheffield et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, vol. 86, 232-236 [0045]

- **Ruafio et al.** *Nucl Acids Res*, 1989, vol. 17, 8392 [0046]
- **Ruafio et al.** *Nucl Acids Res*, 1991, vol. 19, 6877-6882 [0046]
- **Turki et al.** *J Clin Invest*, 1995, vol. 95, 1635-1641 [0046]
- **D.L. Hartl et al.** *Principles of Population Genomics*. Sinauer Associates, 1997 [0047]
- 5 • **Michalotos-Beloin et al.** *Nucl Acids Res*, 1996, vol. 24, 4841-4843 [0047] [0048]
- **Bailey NTJ.** *Statistical Methods in Biology*. Cambridge Univ. Press, 1997 [0052]
- **Waterman MS.** *Introduction to Computational Biology*. CRC Press, 2000 [0052]
- *Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc, 2001 [0052]
- **L.D. Fisher ; G. vanBelle.** *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences*. Wiley-Interscience, 1993 [0062]
- 10 • *Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry*. **R. Judson.** *Reviews in Computational Chemistry*. VCH Publishers, 1997, vol. 10, 1-73 [0063]
- **Press et al.** *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, 1992 [0063]
- **E. Rich ; K. Knight.** *Artificial Intelligence*. Mc- Graw-Hill, 1991 [0063]
- *In: Recombinant DNA*. W.H. Freeman and Company, 254-272 [0083]
- 15 • *Current Protocols in Molecular Biology*. 1997, vol. I-III [0084]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0084]
- *DNA Cloning: A Practical Approach*. 1985, vol. I, II [0084]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0084]
- *Nucleic Acid Hybridization*. 1985 [0084]
- 20 • *Transcription and Translation*. 1984 [0084]
- *Animal Cell Culture*. 1986 [0084]
- *Immobilized Cells and Enzymes*. IRL Press, 1986 [0084]
- *A Practical Guide to Molecular Cloning*. **Perbal.** *Methods in Enzymol.* Academic Press, Inc, 1984 [0084]
- *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0084]
- 25 • *Methods in Enzymology*. vol. 154,155 [0084]
- **Tom Strachan ; Andrew, Read.** *Human Molecular Genetics*. John Wiley and Sons, Inc. Publication, 1999 [0088]
- *Curr. Prot. Mol. Biol.* John Wiley & Sons, 1987 [0105]
- **Guatelli et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 1874-1878 [0108]
- **Kwoh et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 1173-1177 [0108]
- 30 • **Lizardi et al.** *Biol. Technology*, 1988, vol. 6, 1197 [0108]
- **Lyamichev V et al.** *Nat Biotechnol*, 1999, vol. 17, 292-6 [0125]
- **RyanDet al.** *Mol Diagn*, 1999, vol. 4, 135-44 9 [0125]
- **Hochepped T et al.** *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, vol. 14, 25-34 [0133]

- **Israili ZH ; Dayton PG.** *Drug Met Rev*, 2001, vol. 33, 161-235 **[0133]**
- **Webb GC et al.** *Cytogenet Cell Genet*, 1998, vol. 47, 18-21 **[0134]**
- **Yuasa I et al.** *HumGenet*, 1997, vol. 99, 393-8 **[0134]**
- **SpurdleAB et al.** *Pharmacogenetics*, July 2002, vol. 12, 355-66 **[0137]**
- 5 • **Goodwin B et al.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, vol. 42, 1-23 **[0137]**
- **Jarvelainen HA et al.** *Hepatology*, 2001, vol. 33, 1148-53 **[0139]**
- **Ramadori G ; Christ B.** *Semin Liver Dis*, 1999, vol. 19, 141-55 **[0139]**
- **Jouvenne P et al.** *Eur Cytokine Netw*, 1999, vol. 10, 33-6 **[0141]**
- **Jaeschke H et al.** *Toxicol Sci*, 2002, vol. 65, 166-76 **[0144]**
- 10 • **Paul WE.** *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 1999 **[0144] [0145]**
- **Nagakawa J et al.** *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1991, vol. 13, 485-98 **[0144]**
- **Mandrup-Poulsen T et al.** *Cytokine*, 1993, vol. 5, 185-81 **[0145]**
- **Vassiliadis S et al.** *Mediators Inflamm*, 1999, vol. 8, 85-91 **[0145]**

15