

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 274**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2009 E 12185155 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2540843**

54 Título: **Polimorfismos genéticos en degeneración macular relacionada con la edad**

30 Prioridad:

05.11.2008 US 111667 P
01.05.2009 US 174856 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2014

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

GRAHAM, ROBERT R.;
BEHRENS, TIMOTHY W.;
IANCHULEV, TSONTCHO y
SHAPIRO, HOWARD

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 498 274 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

Polimorfismos genéticos en degeneración macular relacionada con la edad

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere en líneas generales al tratamiento de enfermedades humanas. Más específicamente, la invención se refiere a degeneración macular relacionada con la edad (DME) húmeda.

10 **Antecedentes de la invención**

La DME es una causa principal de pérdida de visión severa e irreversible entre los ancianos. Bressler (2004) JAMA 291:1900-01. Se caracteriza por un amplio espectro de hallazgos clínicos y patológicos, incluyendo manchas amarillentas pálidas conocidas como drusas, alteración del epitelio pigmentado de la retina (RPE), neovascularización corioidea (CNV), y degeneración macular disciforme. Las manifestaciones de la enfermedad se clasifican en dos formas: no exudativa (seca) y exudativa (húmeda o neovascular). Recientemente, se han aprobado varias terapias para el tratamiento de DME húmeda - terapia fotodinámica usando verteporfina (Visudyne®); un aptámero a unión a VEGF, pegaptantib (Macugen®); y un fragmento de anticuerpo anti-VEGF, ranibizumab (Lucentis®).

Existen polimorfismos genéticos en una población cuando diferentes alelos en genes particulares producen diferentes fenotipos, incluyendo el desarrollo o progresión de enfermedades y sensibilidad a fármacos terapéuticos. Se han identificado múltiples polimorfismos que están asociados con el desarrollo o progresión de DME (por ejemplo, Despret et al. (2007) Arch. Ophthalmol. 125:1270-71; Seddon et al. (2007) JAMA 297:1793-99, 2585; Boon et al. (2008) Ana. J. Human Genet. 82:516-23). Los trabajos previos han demostrado que polimorfismos particulares en la posición del aminoácido 402 del gen del factor del complemento H (CFH) están asociados con respuesta a PDT con terapia con verteporfina o bevacizumab fuera de lo indicado para DME (Brantley et al. (2008) publicado online en Eye el 22 de febrero, pág. 1-6; Brantley et al. (2007) Ophthalmology 114:2168-73). La identificación de polimorfismos predictivos de la eficacia o seguridad de terapias particulares puede usarse para adaptar mejor las terapias a aquellos pacientes que se beneficiarían más de ellas.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en parte en la identificación de polimorfismos genéticos que son predictivos de riesgo de DME o una probabilidad aumentada de que tratamiento con anticuerpos anti-VEGF de alta afinidad beneficie a pacientes con DME.

Se describe un método para predecir si un paciente con DME húmeda tiene probabilidad aumentada de beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF de alta afinidad, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para un polimorfismo genómico en el alelo *Y402H* del gen del factor del complemento H (CFH) correspondiente a rs1061170, donde el paciente tiene una probabilidad aumentada de beneficiarse de dicho tratamiento si el genotipo correspondiente comprende CC o CT. La invención proporciona un método para predecir si un paciente con DME húmeda tiene probabilidad aumentada de beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para un polimorfismo genómico en el alelo *1802V* del gen del componente del complemento C5 (C5) correspondiente a rs17611, donde el paciente tiene probabilidad aumentada de beneficiarse de dicho tratamiento si el genotipo correspondiente comprende AA o AG. También se describe un método para predecir si un paciente con DME húmeda tiene probabilidad aumentada de beneficiarse de tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para un polimorfismo genómico en el alelo *A69S* de la serina proteasa 1 HrtA (*HTRA1*) correspondiente a rs10490924, donde el paciente tiene probabilidad aumentada de beneficiarse de dicho tratamiento si el genotipo correspondiente comprende GT. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente tratar al paciente con un anticuerpo anti-VEGF.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC® HB 10709. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada: CDRH1 (GYDFTHYGMN; SEC ID N° 1), CDRH2 (WINTYTGPEPTYAADFKR; SEC ID N° 2) y CDRH3 (YPYYYGTSHWYFDV; SEC ID N° 3) y un dominio variable de cadena ligera que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera: CDRL1 (SASQDISNYLN; SEC ID N° 4), CDRL2 (FTSSLHS; SEC ID N° 5) y CDRL3 (QQYSTVPWT; SEC ID N° 6). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF tiene el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera de Y0317. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF es ranibizumab.

Se describe un kit para predecir si un paciente con DME húmeda tiene probabilidad aumentada de beneficiarse de tratamiento con ranibizumab, que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido específicos para un polimorfismo C/T en el alelo *Y402H* de CFH correspondiente a rs1061170. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden usarse para amplificar una parte del gen CFH que comprende un polimorfismo C/T en el

alelo Y402H de CFH.

Los métodos de la invención pueden emplear un kit que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido específicos para un polimorfismo A/G en el alelo 1802V de C5 correspondiente a rs17611. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden usarse para amplificar una parte del gen C5 que comprende un polimorfismo A/G en el alelo 1802V de C5.

También se describe un kit para predecir si un paciente con DME húmeda tiene probabilidad aumentada de beneficiarse de tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF, que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido específicos para un polimorfismo G/T en el alelo A69S de *HTRA1* correspondiente a rs10490924. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden usarse para amplificar una parte del gen CFH que comprende un polimorfismo G/T en el alelo A69S de *HTRA1*.

Se describe un método para predecir si un individuo tiene probabilidad aumentada de desarrollar DME, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para un polimorfismo genómico en el alelo 1145V de C5 correspondiente a rs17216529, donde el paciente tiene probabilidad aumentada de desarrollar DME si el genotipo correspondiente comprende GG o AG.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para predecir si un individuo tiene probabilidad aumentada de desarrollar DME húmeda o DME seca con GA, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para un polimorfismo genómico en el alelo 1802V de C5 correspondiente a rs17611, donde el paciente tiene probabilidad aumentada de desarrollar DME si el genotipo correspondiente comprende el alelo para ile.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que pertenecen a las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, cd., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

Salvo que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un especialista en la técnica a la cual pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4ª ed., John Wiley & Sons (Nueva York, N.Y. 1992), proporcionan a los especialistas en la técnica directrices generales para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

Definiciones

Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen el plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "una" célula también incluirá "células".

La expresión "que comprende" pretende indicar que las composiciones y métodos incluyen los elementos recitados, pero no excluyen otros.

Los términos "VEGF" y "VEGF-A" se usan de forma intercambiable para hacer referencia al factor de crecimiento celular del endotelio vascular de 165 aminoácidos y/o factores de crecimiento celular del endotelio vascular de 121, 189, y 206 aminoácidos relacionados, descritos por Leung et al. Science, 246:1306 (1989), y Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas y procesadas de origen natural de los mismos.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. Preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede usarse como agente terapéutico para abordar e interferir con enfermedades o afecciones donde está implicada la actividad VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, u otros factores de crecimiento tales como P1GF, PDGF o bFGF. Un anticuerpo anti-VEGF preferido es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC® HB 10709 y es un anticuerpo anti-VEGF de alta afinidad. Un "anticuerpo anti-VEGF de alta afinidad" tiene al menos una afinidad 10 veces mejor por VEGF que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1. Preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF es un fragmento del anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con el documento WO 98/45331, que incluye un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de Y0317. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF es el fragmento de anticuerpo conocido como ranibizumab (Lucentis®).

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpo monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada.

5 "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen un trastorno así como aquellos en que tiene que prevenirse el trastorno.

10 El término "polimorfismo" se refiere a una localización en la secuencia de un gen que varía dentro de una población. Un polimorfismo está compuesto por diferentes "alelos". La localización de dicho polimorfismo puede identificarse por su posición en el gen y los diferentes aminoácidos y bases que se encuentran ahí. Por ejemplo, *Y402H CFH* indica que hay variación entre tirosina (Y) e histidina (H) en la posición del aminoácido 402 en el gen *CFH*. Este cambio de aminoácido es el resultado de dos posibles bases variantes, C y T, que son dos alelos diferentes. Como
15 el genotipo está compuesto por dos alelos diferentes, puede observarse cualquiera de varias variantes posibles en un individuo cualquiera (por ejemplo, para este ejemplo, CC, CT, o TT). A los polimorfismos individuales también se les asignan identificadores únicos ("SNP de Referencia", "refSNP" o "rs#") conocidos para los especialistas en la técnica y usados, por ejemplo, en la Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation disponible en el sitio web NCBI.

20 El término "genotipo" se refiere a los alelos específicos de un cierto gen en una muestra celular o tisular. En el ejemplo anterior, CC, CT, o TT son genotipos posibles en el polimorfismo *Y402H CFH*.

25 El término "muestra" incluye una muestra celular o tisular tomada de un paciente. Por ejemplo, una muestra puede incluir una muestra de piel, una muestra de células de la mejilla, o células sanguíneas.

La identificación del genotipo particular en una muestra puede realizarse por cualquiera de varios métodos bien conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, la identificación del polimorfismo puede conseguirse clonando el alelo y secuenciándolo usando técnicas bien conocidas en la técnica. Como alternativa, las secuencias
30 génicas pueden amplificarse a partir de ADN genómico, por ejemplo, usando PCR, y el producto secuenciado. A continuación se describen varios métodos no limitantes para analizar el ADN de un paciente para mutaciones en un locus genético dado.

Puede usarse tecnología de microserie de ADN, por ejemplo, dispositivos de chip de ADN y microseries de alta
35 densidad para aplicaciones de cribado de alta resolución y microseries de densidad inferior. Se conocen métodos para la fabricación de microseries en la técnica e incluyen diversas tecnologías y procesos de deposición o aplicación puntual por inyección de tinta y microchorro, procesos de síntesis de oligonucleótidos por fotolitografía *in situ* o sobre chip, y procesos electrónicos para dirigir sondas de ADN. Las aplicaciones de hibridación de microserie de ADN se han aplicado satisfactoriamente en las áreas de análisis de expresión génica y genotipado para
40 mutaciones puntuales, polimorfismos de un único nucleótido (SNP), y repeticiones en tándem cortas (STR). Métodos adicionales incluyen microseries de ARN de interferencia y combinaciones de microseries y otros métodos tales como microdissección de captura láser (LCM), hibridación genómica comparativa (CGH) e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Véase, por ejemplo, He et al. (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593:117-133 y Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:129-153. Otros métodos incluyen PCR, xMAP, ensayo invasor, espectrometría de masas, y pirosecuenciación (Wang et al. (2007) *Microarray Technology and Cancer Gene Profiling Vol 593* de la serie de libros *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pub. Springer Nueva York).

Otro método de detección es hibridación específica de alelo usando sondas que solapan el sitio polimórfico y que
50 tienen aproximadamente 5, o alternativamente 10, o alternativamente 20, o alternativamente 25, o alternativamente 30 nucleótidos alrededor de la región polimórfica. Por ejemplo, se unen varias sondas capaces de hibridar específicamente a la variante alélica a un soporte en fase sólida, por ejemplo, un "chip". Los oligonucleótidos pueden unirse a un soporte sólido mediante diversos procesos, incluyendo litografía. El análisis de detección de mutaciones usando estos chips que comprenden oligonucleótidos, también llamados "series de sondas de ADN" se describe, por
55 ejemplo, en Cronin et al. (1996) *Human Mutation* 7:244.

En otros métodos de detección, es necesario amplificar primero al menos una parte del gen antes de identificar la variante alélica. La amplificación puede realizarse, por ejemplo, por PCR y/o LCR u otros métodos bien conocidos en la técnica.

60 En algunos casos, la presencia del alelo específico en el ADN de un sujeto puede demostrarse por análisis con enzimas de restricción. Por ejemplo, el polimorfismo de nucleótido específico puede producir una secuencia de nucleótidos que comprende un sitio de restricción que está ausente de la secuencia de nucleótidos de otra variante alélica.

65 En una realización adicional, puede usarse protección contra agentes de escisión (tales como una nucleasa, hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina) para detectar bases desapareadas en heterodúplex ARN/ARN,

ADN/ADN, o ARN/ADN (véase, por ejemplo, Myers et al. (1985) *Science* 230:1242). En general, la técnica de "escisión de desapareamiento" se inicia proporcionando heterodúplex formados por hibridación de un ácido nucleico de control, que está opcionalmente marcado, por ejemplo, ARN o ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos de la variante alélica del gen con un ácido nucleico muestra, por ejemplo, ARN o ADN, obtenido de una muestra tisular. Los dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde regiones monocatenarias del dúplex tales como dúplex formados basados en desapareamientos de pares de bases entre las hebras de control y de muestra. Por ejemplo, los dúplex ARN/ADN pueden tratarse con ARNasa y los híbridos ADN/ADN pueden tratarse con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones desapareadas. Como alternativa, pueden tratarse dúplex ADN/ADN o ARN/ADN con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina para digerir las regiones desapareadas. Después de la digestión de las regiones desapareadas, el material resultante después se separa por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturizantes para determinar si los ácidos nucleicos de control y de muestra tienen una secuencia idéntica de nucleótidos o en qué nucleótidos son diferentes. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.455.249, Cotton et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba et al. (1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295.

También pueden usarse alteraciones en la movilidad electroforética para identificar la variante alélica particular. Por ejemplo, puede usarse polimorfismo conformacional de una única hebra (SSCP) para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo silvestre (Orita et al. (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766; Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 y Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Los fragmentos de ADN monocatenarios de los ácidos nucleicos de muestra y de control se desnaturizan y se permite renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía de acuerdo con la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética posibilita la detección de incluso un único cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede potenciarse usando ARN (en lugar de ADN), en que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En otra realización preferida, el método utiliza análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias basándose en cambios en la movilidad electroforética (Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7:5).

La identidad de la variante alélica también puede obtenerse analizando el movimiento de un ácido nucleico que comprende la región polimórfica en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente desnaturizante, que se ensaya usando electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (Myers et al. (1985) *Nature* 313:495). Cuando se usa DGGE como método de análisis, se modificará el ADN para asegurar que no se desnaturiza completamente, por ejemplo añadiendo una pinza GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alto punto de fusión por PCR. En una realización adicional, se usa un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de agente desnaturizante para identificar diferencias en la movilidad del ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:1275).

Ejemplos de técnicas para detectar diferencias de al menos un nucleótido entre 2 ácidos nucleicos incluyen, aunque sin limitación, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva, o extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, pueden prepararse sondas oligonucleotídicas en las que se coloca el nucleótido polimórfico conocido de forma central (sondas específicas de alelo) y después pueden hibridarse con un ADN diana en condiciones que permitan la hibridación solamente si se halla un apareamiento perfecto (Saiki et al. (1986) *Nature* 324:163; Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230). Dichas técnicas de hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo pueden usarse para la detección de los cambios de nucleótidos en la región polimórfica del gen. Por ejemplo, se unen oligonucleótidos que tienen la secuencia de nucleótidos de la variante alélica específica a una membrana de hibridación y esta membrana después se hibrida con el ácido nucleico de muestra marcado. El análisis de la señal de hibridación entonces revelará la identidad de los nucleótidos del ácido nucleico de muestra.

Como alternativa, puede usarse tecnología de amplificación específica de alelo que depende de amplificación selectiva por PCR junto con la presente invención. Los oligonucleótidos usados como cebadores para amplificación específica pueden portar la variante alélica de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación dependa de hibridación diferencial) (Gibbs et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador donde, en condiciones apropiadas, puede evitarse el desapareamiento, o reducirse la extensión por polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238 y Newton et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2503). Esta técnica también se llama "PROBE" por Probe Oligo Base Extension. Además puede ser deseable introducir un sitio de restricción en la región de la mutación para crear detección basada en escisión (Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell. Probes* 6:1).

En otra realización, la identificación de la variante alélica se realiza usando un ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA), como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 4.998.617 y en Laridegren, U. et al. *Science* 241:1077-1080 (1988). El protocolo OLA usa dos oligonucleótidos que están diseñados para ser capaces de hibridar con secuencias colindantes de una única hebra de una diana. Uno de los oligonucleótidos se une a un marcador de separación, por ejemplo, biotinilado, y el otro se marca de forma detectable. Si se halla la secuencia complementaria precisa en la molécula diana, los oligonucleótidos hibridarán de modo que sus extremos linden, y crearán un sustrato de ligamiento. El ligamiento entonces permite recuperar el oligonucleótido marcado usando avidina, u otro ligando de biotina. Nickerson, D. A. et al. han descrito un ensayo de detección de ácido nucleico que combina atributos de PCR y OLA (Nickerson, D. A. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-

8927). En este método, se usa PCR para conseguir la amplificación exponencial de ADN diana, que después se detecta usando OLA.

La invención proporciona métodos para detectar un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en *CFH* y *C5*. Como los polimorfismos de un único nucleótido están flanqueados por regiones de secuencia invariante, su análisis requiere no más de la determinación de la identidad del único nucleótido variante y es innecesario determinar una secuencia génica completa para cada paciente. Se han desarrollado varios métodos para facilitar el análisis de SNP.

El polimorfismo de una única base puede detectarse usando un nucleótido resistente a exonucleasa especializado, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 4.656.127. De acuerdo con el método, se permite que un cebador complementario a la secuencia alélica inmediatamente 3' al sitio polimórfico hibride con una molécula diana obtenida de un animal o ser humano particular. Si el sitio polimórfico en la molécula diana contiene un nucleótido que es complementario al derivado del nucleótido resistente a exonucleasa particular presente, entonces ese derivado se incorporará en el extremo del cebador hibridado. Dicha incorporación convierte al cebador resistente a exonucleasa, y de este modo permite su detección. Como la identidad del derivado resistente a exonucleasa de la muestra es conocida, un hallazgo de que el cebador ha llegado a ser resistente a exonucleasa revela que el nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana era complementario al del derivado de nucleótido usado en la reacción. Este método tiene la ventaja de que no requiere la determinación de grandes cantidades de datos de secuencia ajena.

También puede usarse un método basado en solución para determinar la identidad del nucleótido del sitio polimórfico (documento WO 91/02087). Como anteriormente, se emplean un cebador que es complementario a secuencias alélicas inmediatamente 3' a un sitio polimórfico. El método determina la identidad del nucleótido de ese sitio usando derivados de didesoxinucleótidos marcados que, si son complementarios al nucleótido del sitio polimórfico, llegarán a incorporarse en el extremo del cebador.

Un método alternativo se describe en el documento WO 92/15712. Este método usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia 3' a un sitio polimórfico. El terminador marcado que se incorpora se determina de este modo por, y complementario a, el nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que se está evaluando. El método habitualmente es un ensayo en fase heterogénea, en que el cebador o la molécula diana se inmovilizan en una fase sólida.

Se han descritos muchos otros procedimientos de incorporación de nucleótidos guiados por cebador para ensayar sitios polimórficos en ADN (Komher, J. S. et al. (1989) Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784; Sokolov, B. P. (1990) Nucl. Acids Res. 18:3671; Syvanen, A.-C., et al. (1990) Genomics 8:684-692; Kuppawamy, M. N. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1143-1147; Prezant, T. R. et al. (1992) Hum. Mutat. 1: 159-164; Ugozzoli, L. et al. (1992) GATA 9:107-112; Nyren, P. et al. (1993) Anal. Biochem. 208:171-175). Estos métodos dependen todos de la incorporación de desoxinucleótidos marcados para discriminar entre bases en un sitio polimórfico.

Además, se entenderá que cualquiera de los métodos anteriores para detectar alteraciones en un gen o producto génico o variantes polimórficas puede usarse para controlar el curso de tratamiento o terapia.

Los métodos descritos en este documento pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico pre-ensados, tales como los descritos a continuación, que comprenden al menos una sonda o ácido nucleico cebador, que pueden usarse convenientemente, por ejemplo, para determinar si un individuo tiene probabilidad aumentada de desarrollar DME o si un paciente con DME húmeda tiene probabilidad aumentada de beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF.

El ácido nucleico de muestra para su uso en los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos anteriormente puede obtenerse de cualquier tipo celular o tejido de un sujeto. Por ejemplo, puede obtenerse el fluido corporal de un sujeto (por ejemplo, sangre) por técnicas conocidas. Como alternativa, pueden realizarse ensayos de ácido nucleico sobre muestras secas (por ejemplo, cabello o piel).

La invención descrita en este documento se refiere a métodos definidos en las reivindicaciones para determinar e identificar el alelo presente en el alelo *1802V C5*. Pueden usarse sondas para determinar directamente el genotipo de la muestra o pueden usarse simultáneamente con o después de amplificación. El término "sondas" incluye ácidos nucleicos mono o bicatenarios de origen natural o recombinante o ácidos nucleicos sintetizados de forma química. Pueden marcarse por traslado de mella, reacción de rellenado por Klenow, PCR u otros métodos conocidos en la técnica. Las sondas de la presente invención, su preparación y/o marcaje se describen en Sambrook et al. (1989) *supra*. Una sonda puede ser un polinucleótido de cualquier longitud adecuado para hibridación selectiva con un ácido nucleico que contenga una región polimórfica de la invención. La longitud de la sonda usada dependerá, en parte, de la naturaleza del ensayo usado y las condiciones de hibridación empleadas.

También pueden usarse sondas marcadas junto con amplificación de un polimorfismo. (Holland et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280). La patente de Estados Unidos N° 5.210.015 describe enfoques basados en fluorescencia para proporcionar mediciones a tiempo real de productos de amplificación durante PCR. Dichos

enfoques han empleado colorantes intercalantes (tales como bromuro de etidio) para indicar la cantidad de ADN bicatenario presente, o han empleado sondas que contienen pares de fluorescencia-inactivadores (también mencionado como el enfoque "TaqMan®") donde la sonda se escinde durante la amplificación para liberar una molécula fluorescente cuya concentración es proporcional a la cantidad de ADN bicatenario presente. Durante la amplificación, la sonda se digiere por la actividad nucleasa de una polimerasa cuando hibrida con la secuencia diana para causar que la molécula fluorescente se separe de la molécula inactivadora, causando de este modo que aparezca fluorescencia desde la molécula indicadora. El enfoque TaqMan® usa una sonda que contiene un par de molécula indicadora--molécula inactivadora que hibrida específicamente con una región de un polinucleótido diana que contiene el polimorfismo.

Las sondas pueden fijarse a superficies para su uso como "chips génicos". Dichos chips génicos pueden usarse para detectar variaciones genéticas por varias técnicas conocidas para un especialista en la técnica. En una técnica, se disponen en serie oligonucleótidos sobre un chip génico para determinar la secuencia de ADN de a por secuencia por enfoque de hibridación, tal como se resume en las patentes de Estados Unidos N° 6.025.136 y 6.018.041. Las sondas de la invención también pueden usarse para detección fluorescente de una secuencia genética. Dichas técnicas se han descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.968.740 y 5.858.659. También puede fijarse una sonda a una superficie de electrodo para la detección electroquímica e secuencias de ácido nucleico tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.952.172 y por Kelley, S. O. et al. (1999) Nucl. Acids Res. 27:4830-4837.

Adicionalmente, los ácidos nucleicos aislados usados como sondas o cebadores pueden modificarse para llegar a ser más estables. Moléculas de ácido nucleico ejemplares que se modifican incluyen análogos fosforamidato, fosfotioato y metilfosfonato de ADN (véanse también las patentes de Estados Unidos N° 5.176.996; 5.264.564 y 5.256.775).

Como se expone en este documento, la invención también proporciona métodos de diagnóstico para determinar el tipo de variantes alélicas de regiones polimórficas presentes en C5. En algunas realizaciones, los métodos usan sondas o cebadores que comprenden secuencias de nucleótidos que son complementarias a una región polimórfica de C5.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención emplean un kit para determinar si un paciente con DME húmeda tiene probabilidad aumentada de beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF, incluyendo un anticuerpo anti-VEGF de alta afinidad. Dichos kits contienen una o más de las composiciones descritas en este documento e instrucciones para su uso. Los oligonucleótidos "específicos para" un locus genético se unen a la región polimórfica del locus o se unen adyacentes a la región polimórfica del locus. Para oligonucleótidos que tienen que usarse como cebadores para amplificación, los cebadores son adyacentes si están suficientemente cerca para usarse para producir un polinucleótido que comprenda la región polimórfica. En una realización, los oligonucleótidos están adyacentes si se unen en aproximadamente 1-2 kb, por ejemplo menos de 1 kb desde el polimorfismo. Los oligonucleótidos específicos son capaces de hibridar con una secuencia, y en condiciones adecuadas no se unirán a una secuencia que difiera en un único nucleótido.

El kit puede comprender al menos una sonda o cebador que es capaz de hibridar específicamente con la región polimórfica del C5 e instrucciones para su uso. Los kits habitualmente comprenden al menos uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Los kits para amplificar al menos una parte de C5 generalmente comprenden dos cebadores, al menos uno de los cuales es capaz de hibridar con la secuencia de la variante alélica. Dichos kits son adecuados para la detección del genotipo por, por ejemplo, detección de fluorescencia, por detección electroquímica, o mediante otra detección.

Los oligonucleótidos, se usen como sondas o cebadores, contenidos en un kit pueden marcarse de forma detectable. Los marcadores pueden detectarse directamente, por ejemplo para marcadores fluorescentes, o indirectamente. La detección indirecta puede incluir cualquier método de detección conocido para un especialista en la técnica, incluyendo interacciones biotina-avidina, unión de anticuerpos y similares. Los oligonucleótidos marcados de forma fluorescente también pueden contener una molécula inactivadora. Los oligonucleótidos pueden unirse a una superficie. En algunas realizaciones, la superficie es sílice o vidrio. En algunas realizaciones, la superficie es un electrodo metálico.

Otros kits más comprenden al menos un reactivo necesario para realizar el ensayo. Por ejemplo, el kit puede comprender una enzima. Como alternativa el kit puede comprender un tampón o cualquier otro reactivo necesario.

Los kits pueden incluir todos o algunos de los controles positivos, controles negativos, reactivos, cebadores, marcadores de secuenciación, sondas y anticuerpos descritos en este documento para determinar el genotipo del sujeto en la región polimórfica de C5.

El siguiente ejemplo pretende ilustrar simplemente la práctica de la presente invención y no se proporciona a modo de limitación.

Ejemplo**Ejemplo 1. Polimorfismos genéticos en CFH, HTRA1 y C5 y su asociación con la aparición de DME y resultados de tratamiento**

5 *Polimorfismos*

Se ensayaron diversos polimorfismos para la variación asociada con un resultado favorable durante terapia anti-VEGF usando ranibizumab. Estos polimorfismos se eligieron porque son ocho alelos de 5 loci examinados que previamente se ha informado que están asociados con susceptibilidad a DME (Tabla 1). Específicamente, se genotiparon dos alelos del factor del complemento H (CFH), serina peptidasa HTRA/susceptibilidad a maculopatía relacionada con la edad 2 (HTRA1/ARMS3), factor del complemento 2/ preproteína del factor del complemento B (C2/BF), y un único alelo del factor del complemento 3 (C3), y receptor 1 de quimioquinas (motivo CX3-C) (CX3CR1) en 352 muestras de DME a partir del ensayo DAWN usando PCR cuantitativa mediante el sistema TaqMan®. Además, se ensayaron dos alelos para el componente del complemento 5 (C5) (Tabla 2). Se usó el protocolo experimental convencional proporcionado por ABI para el genotipado de todos los ensayos en la Tabla 1. En resumen, los ensayos se ejecutaron en una máquina ABI 7500, usando las siguientes condiciones de ciclo: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 92 °C y 1 min a 60 °C.

Tabla 1. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) ensayados

Locus	SNP	Cromosoma	Posición cromosómica*	Información de alelos sin sentido	Referencia
CFH	rs1061170	1	193.390.894	Y402H	Maller et al. (2006) Nature Genet. 38:1055-59
CFH	rs1410996	1	193.428.590	--	Maller et al. <i>supra</i>
HTRA1	rs11200638	10	124.210.534		Dewan et al. (2006) Science 314:989-92; Yang et al. (2006) Science 314:992-93
HTRA1	rs10490924	10	124.204.438	A69S	Kanda et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:16227-32
C3	rs2230199	19	6.669.387	--	Yates et al. (2007) NEJM 357:553
C2/BF	rs547154	6	32.018.917	intrón C2 (LD con L9H en BF)	Gold et al. (2006) Nature Genet. 38:458-62
C2/BF	rs9332739	6	32.011.783	E318D (C2)	Gold et al. <i>supra</i>
CX3CR1	rs3732378	3	39.282.166	M280T	Chan et al. (2005) Histol. Histopath. 20:857-63

* Posición en pares de bases del ensamblaje de genoma humano de mayo de 2004.

Tabla 2. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) ensayados para C5

Locus	SNP	Cromosoma	Posición cromosómica*	Información de alelos sin sentido	Referencia
C5	rs17216529	9	120.879.772	I145V	
C5	rs17611	9	120.848.754	I802V	

* Posición en pares de bases del ensamblaje de genoma humano de mayo de 2004.

Muestras

Se recogieron muestras de sangre periférica de 352 sujetos no identificables de ensayos centrales Lucentis® (MARINA, ANCHOR, y FOCUS) que participaron en el estudio genético DAWN del ensayo de extensión HORIZON y se asiló el ADN genómico. Todas las muestras tenían un diagnóstico confirmado de DME neovascular, un 60 % eran de pacientes mujeres, y la edad promedio al inicio era de 75,0 años de edad para simulado/PDT y 75,6 años de edad para los tratados con ranibizumab. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los individuos en el estudio y se aprobaron los protocolos del estudio por comités de revisión institucional. El ADN se extrajo usando el kit tisular DNeasy® (Qiagen, Valencia, CA). Los SNP se genotiparon con PCR a tiempo real basada en TaqMan®. Para dos de los SNP se usaron cebadores personalizados (Tabla 4) y para los otros seis se usaron cebadores patentados por ABI (Tabla 3). Los 2 SNP de C5 (oligonucleótidos mostrados en la Tabla 5) se tiparon como parte de un panel de ensayo de 96 SNP personalizado usando la plataforma Illumina® GoldenGate.

Tabla 3. Ensayos usados para genotipar SNP

ID de Sec del SNP de Ref.	Símbolo del gen	ID del ensayo ABI*
rs1061170	CFH	Personalizado
rs1410996	CFH	C__2530294_10
rs11200638	HTRA1; ARMS2	Personalizado
rs10490924	HTRA1; ARMS2	C_29934973_20
rs2230199	C3	C_26330755_10
rs547154	RDBP; CFB; C2	C__940286_10
rs9332739	CFB; C2	C_29531804_10
rs3732378	CX3CR1	C__5687_1_

*Ensayos de genotipado de SNP TaqMan® pre-diseñados (Applied Biosystems, Foster City, CA) estaban disponibles para 6 de los alelos. La ID de ensayo ABI se muestra para los ensayos pre-designados, ya que las secuencias de cebador están patentadas. Los ensayos TaqMan® personalizados se diseñaron para los dos alelos restantes, y los cebadores están en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores usados para genotipar rs1061170 y rs11200638

ID SNP	rs1061170	rs11200638
Cebador directo	CTTTATTTATTTATCATTGTT ATGGTCCTTAGGAAAATGTT ATT (SEC ID N° 7)	GGCGCGGGCTTTCTG (SEC ID N° 11)
Cebador inverso	GGCAGGCAACGTCTATAGAT TTACC (SEC ID N° 8)	CGCGGGACCCTGACC (SEC ID N° 12)
Indicador1_VIC	TTCTCCATAATTTTG (SEC ID N° 9)	CTTCGTCCAGCCGCA (SEC ID N° 13)
Indicador2_FAM	TTCTCCATAATTTTG (SEC ID N° 10)	TTCGTCCGGCCGCA (SEC ID N° 14)

Tabla 5. Cebadores usados para genotipar SNP de C5 rs17216529 y rs17611

ID SNP	rs17216529	rs17611
Cebador	ATATCCTTGTTTTAGCAGAG TTTTTGATTATATCAATTATT CTTACAGTAAAAGTTAGA[A/ G]TTTATTCGTTGAATGACGA CTTGAAGCCAGCCAAAAGAG AAACTGTCTTAACCTTTCATAG (SEC ID N° 15)	TCCAGAAAACAGTTGCAGTTTG CCCTACCTGATTCTCTAACCACC TGGG AAATTC AAGGC [A/G] TTGG CATTTCAAACACTGGTAAGCAG GTTTAAGTGATATATGCATTTAA ATAGTGATTTG (SEC ID N° 16)

Información clínica

5 Se examinó la información clínica de los ensayos Lucentis MARINA, ANCHOR y FOCUS. Específicamente, información relacionada con la autodefinición de raza, sexo, edad al inicio del estudio, el grupo de tratamiento en el estudio inicial, la dosis de Lucentis, el cruce al brazo de tratamiento en el año 2, la presencia de error de dosis, el valor de precisión visual corregido del mejor ojo del estudio (VA) al inicio (BL) en letras, el valor VA del ojo contralateral en BL (letras), el valor VA del ojo del estudio en el mes 12 (letras), el valor VA del ojo contralateral en el mes 12 (letras), presencia de DME neovascular en el ojo contralateral en BL, y clasificación CNV en BL del ojo del estudio.

Asociación a análisis de susceptibilidad

15 Se examinaron los ocho alelos para una asociación a susceptibilidad a enfermedad comparando la frecuencia del alelo en los casos DAWN relativos a muestras de control obtenidas de fuentes disponibles al público. Para rs10490924, rs1410996, rs9332739, y rs3732378, la información de la frecuencia del alelo de control se obtuvo de datos estadísticos resumidos disponibles libremente del Wellcome Trust Case Control consortium (WTCCC (2007) Nature 447:661-78). Las frecuencias del alelo de control y los recuentos de genotipo para los SNP restantes se obtuvieron de un artículo que informaba de la asociación de rs11200638 3, rs2230199 6, rs547154 1. La estadística de asociación se calculó usando tablas de resultado convencionales 2x2.

Asociación del genotipo a las características clínicas iniciales

25 La asociación de los 8 alelos a la precisión visual inicial (VA) se realizó usando VA (letras) en el ojo del estudio en el inicio como un rasgo cuantitativo, con o sin edad en la línea basal añadida como covariado. Se ensayaron 3 clases

de genotipos para diferencias significativas en VA media al inicio. El análisis se realizó usando el software PLINK (Purcell et al. (2007) Am. J. Hum. Genet. 81:559-75). Se ensayó la asociación de los 8 alelos a la presencia de DME neovascular en el ojo contralateral, y la clasificación de enfermedad neovascular (mínimamente clásica, predominantemente clásica, y oculta sin clásica) del ojo del estudio al inicio. La frecuencia de la característica clínica se estratificó por genotipo y se determinó la significancia por un ensayo-t.

Enriquecimiento de alelos de riesgo de DME en DAWN

Confirmando las observaciones publicadas anteriormente, se asociaron alelos de los 8 loci con riesgo de DME neovascular con un $P < 0,05$. Sin embargo, solamente el alelo del locus *CX3CR1* no mostró asociación coherente con el informe original. En las muestras DAWN, el locus *CX3CR1* tiene proporción de probabilidad de 1,12, en contraste con proporciones de probabilidad >3 en el informe original. Se observó una asociación significativa entre rs17216529 (*C5 1145V*) y la aparición de neovascularización coroidea (CNV) en los ojos contralaterales de individuos con DME (Tabla 6). Además, se observó una asociación entre rs17611 (*CS 1802V*) y la aparición de DME húmeda, DME seca con GA, o ambas (Tabla 7). Esta asociación fue más robusta en los casos de DME ($p = 0,0014$) que en los casos de DME seca con GA.

Tabla 6. Asociación del genotipo en rs17216529 (*C5 1145V*) con CNV.

	<i>C5 1145V</i>		
	AA	AG	GG
Porcentaje de pacientes con CNV en el ojo contralateral al inicio	38,7	44,3	54,8
Nº de individuos	93	140	62

Tabla 7. Asociación del genotipo en rs17611 (*C51802V*) con DME húmeda; DME seca con GA; y DME húmeda, DME seca con GA, o ambas.

Tipo de DME	Alelo 1802V	Número de muestras		Frecuencia de alelo		Proporción de probabilidad	Valor-p
		Caso	Control	Caso	Control		
Húmeda	T (ile)	1136	8236	0,420	0,454	0,87	0,0021
Seca con GA	T (ile)	400	8236	0,448	0,454	0,97	0,7168
Húmeda y/o seca con GA	T (ile)	1536	8236	0,423	0,455	0,88	0,0014

Asociación de alelos a características clínicas iniciales

No se observó asociación significativa de los 8 alelos a la precisión visual al inicio. El número de alelos de riesgo del alelo *CFH Y402H* y el alelo *HTRA1A69S* se asoció con la prevalencia de DME neovascular en el ojo contralateral en las muestras, lo que sugiere una vinculación entre el genotipo en estos loci y la gravedad de la enfermedad. El alelo *CFH Y402H* estuvo asociado con el subtipo "predominantemente clásico" de DME neovascular en el ojo del estudio al inicio. El alelo de *CFH* intrónico rs1410996 se asoció con el área de la lesión en CNV y CNV clásica y el alelo *C51802V* se asoció con el área de la lesión en CNV clásica.

Asociación del genotipo con respuesta a terapia con ranibizumab

Las muestras DAWN se separaron en 3 grupos basados en el estado de tratamiento durante los ensayos MARINA, ANCHOR y FOCUS. El grupo tratado con ranibizumab incluía individuos que recibieron dosis de 0,3 mg, 0,5 mg o 0,5 mg + PDT. El grupo simulado/PDT constaba de individuos que recibieron una inyección falsa (SIMULADA) o solamente terapia fotodinámica (PDT). La asociación del cambio en la precisión visual (VA, medida en letras) después de 12 meses de tratamiento se ensayó para una asociación al genotipo para cada uno de los 8 alelos. Se asociaron diferencias significativas en la respuesta de tratamiento con el genotipo en los alelos *CFH Y402H*, *C51802V*, y *HTRA1A69S* (Tablas 8, 9 y 10). Estas variantes se asociaron con cambios en VA en pacientes tratados con ranibizumab mensualmente: el cambio medio de VA a los 12 meses fue de +14,5, +10,8 y +7,0 letras para los genotipos *Y402HCC*, CT y TT, respectivamente; +15,6, +12,2 y +8,8 letras para los genotipos *1802V* AA, AG y GG, respectivamente; y +9,3, +14,1 y +10,5 para los genotipos *A69S* GG, GT y TT, respectivamente. Para los alelos *CFH Y402H*, se observó una tendencia correspondientemente inversa en los grupos de control (simulado/PDT) con un cambio medio en BCVA a los 12 meses de -4,8, -10,2 y -11,5 para los genotipos *Y402H* CC, CT, y TT respectivamente. La diferencia en los resultados a los 12 meses de BCVA media entre los grupos de control y de tratamiento con ranibizumab fue la misma para todos los genotipos de *riesgo Y402H*.

Tabla 8. Asociación del genotipo en CFH Y402H con respuesta a terapia con ranibizumab.

		Y402H CFH		
		CC	CT	TT
Simulado o PDT	Cambio promedio en VA	-4,8	-10,2	-11,5
	Nº de individuos	30	36	10
Tratado con ranibizumab (0,3 mg + 0,5 mg)	Cambio promedio en VA	14,5	10,8	7,0
	Nº de individuos	58	93	23

Tabla 9. Asociación del genotipo en CSI802V con respuesta a terapia con ranibizumab.

		I802V C5		
		AA	AG	GG
Simulado o PDT	Cambio promedio en VA	-11,6	-9,4	-4,8
	Nº de individuos	16	50	44
		I802V C5		
		AA	AG	GG
Tratado con Ranibizumab (0,3 mg + 0,5 mg)	Cambio promedio en VA	15,1	10,6	9,1
	Nº de individuos	36	125	80

Tabla 10. Asociación del genotipo en HTRA1 A69S con respuesta a terapia con ranibizumab.

		I802V C5		
		GG	GT	TT
Simulado o PDT	Cambio promedio en VA	-8,0	-9,0	-4,4
	Nº de individuos	24	60	14
Tratado con Ranibizumab (0,3 mg + 0,5 mg)	Cambio promedio en VA	9,3	14,1	10,5
	Nº de individuos	68	80	49

Lista de secuencias

- 5 <110> GENENTECH, INC.
- <120> POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD
- 10 <130> CMD/FP6849194
- <150> EP09748682.3
- <151> 05-11-2009
- 15 <150> PCT/US2009/063434
- <151> 05-11-2009
- <150> US 61/111,667
- <151> 05-11-2008
- 20 <150> US 61/174,856
- <151> 01-05-2009
- <160> 16
- 25 <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> la secuencia está sintetizada
- <400> 1

Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Met Asn
5 10

5 <210>2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> la secuencia está sintetizada

<400>2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
1 5 10 15

Lys Arg

15 <210>3
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 3

25 Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210>4
30 <211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 4

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
5 10

40 <210>5
<211>7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
5

50 <210>6
<211>9
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

5

<400>6

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
5

10 <210>7

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 7

ctttatttat ttatcattgt tatggtcctt aggaaaatgt tatt 44

20

<210>8

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 8

ggcaggcaac gtctatagat ttacc 25

30

<210> 9

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

40 <400> 9

ttctccata attttg 16

40

<210> 10

<211> 16

45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

50

<400> 10

ttctccata attttg 16

50

<210> 11

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

60

<400> 11

ES 2 498 274 T3

ggcgcgggct ttctg 15

<210> 12
<211> 15
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

10 <400> 12
cgcgggacc tgacc 15

<210> 13
15 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 13
cttcgtccag cgcga 15

25 <210> 14
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 14
35 ttcgtccggc cgca 14

<210> 15
<211> 122
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<
45 <400> 15

atataccttgt ttttagcaga gtttttgatt atatcaatta ttcttacagt 50

aaaagttaga agtttattog ttgaatgacg acttgaagcc agccaaaaga 100

gaaactgtct taactttcat ag 122

50 <210> 16
<211> 122
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 16

ES 2 498 274 T3

tccagaaaac agttgcagtt tgcacctacct gattctctaa ccacctggga 50
aattcaaggc agttggcatt tcaaacctg gtaagcaggt ttaagtgata 100
tatgcattta aatagtgatt tg 122

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir si un paciente con DME húmeda tiene mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para el polimorfismo I802V genómico en el gen del componente del complemento C5 (C5) que es rs17611, en donde el paciente tiene mayor probabilidad de beneficiarse de dicho tratamiento si el genotipo correspondiente comprende AA o AG.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC® HB 10709.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti-VEGF tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada: CDRH1 (GYDFTHYGMN; SEC ID N° 1), CDRH2 (WINTYTGEPITYAADFKR; SEC ID N° 2) and CDRH3 (YPYYGTSHWYFDV; SEC ID N° 3) y un dominio variable de cadena ligera que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera: CDRL1 (SASQDISNYLN; SEC ID N° 4), CDRL2 (FTSSLHS; SEC ID N° 5) and CDRL3 (QQYSTVPWT; SEC ID N° 6).
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-VEGF es ranibizumab.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el genotipo correspondiente comprende AA.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el genotipo correspondiente comprende AG.
- 25 7. Un método para predecir si un individuo tiene una mayor probabilidad de desarrollar DME húmeda o DME seca con GA, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para el polimorfismo I802V genómico en el C5 que es rs17611, en donde el paciente tiene una mayor probabilidad de desarrollar DME si el genotipo correspondiente comprende el alelo que codifica Ile.