



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105164276 B

(45)授权公告日 2020.01.14

(21)申请号 201480017986.1

(22)申请日 2014.03.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105164276 A

(43)申请公布日 2015.12.16

(30)优先权数据
13161386.1 2013.03.27 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/055790 2014.03.24

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/154606 EN 2014.10.02

(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 马里-皮埃尔·迪贝
埃里克·J·尼泽尔

让-克洛德·塔迪夫

鲁基·乌普马纽

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张国梁 王旭

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6883(2018.01)

(56)对比文件
W0 2006099142 A2,2006.09.21,
JP 2006288279 A,2006.10.26,
Gregory G..Schwartz et al..“Rationale
and design of the dal-OUTCOMES trial:
Efficacy and safety of dalcetrapib in
patients with recent acute coronary
syndrome”.《American Heart Journal》.2009,
第158卷(第6期),

审查员 江涵

权利要求书1页 说明书39页
序列表5页 附图7页

(54)发明名称

用于预测对于治疗的响应性的遗传标记

(57)摘要

本发明提供用于选择将受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是利用CETP抑制剂/调节剂的治疗的患有心血管疾病的患者的基因分型方法和组合物。

1. 达塞曲匹在制备用于减少已经鉴定为在ADCY9基因中的一个或多个多态性位点具有提高的应答基因型的受试者中心血管事件风险的药物中的应用,其中所述提高的应答基因型是以下中的一个或多个:rs1967309/AA,rs1967309/AG,rs12595857/GG,rs12595857/AG,rs111590482/AG,rs111590482/GG,rs11647828/GG,rs11647828/AG,rs12935810/GG,rs17136707/GG,rs17136707/AG,rs2239310/GG,rs2239310/AG,rs2283497/AA,rs2283497/CA,rs2531967/AA,rs2531967/GA,rs3730119/AA,rs3730119/GA,rs4786454/AA,rs4786454/GA,rs74702385/GA,rs74702385/AA,rs8049452/GG,rs8049452/GA,rs8061182/AA,rs8061182/AG和rs13337675/AG,和其中所述受试者具有急性冠状动脉综合症。

2. 权利要求1所述的应用,其中提高的响应基因型是以下中的一个或多个:rs1967309/AA,rs12595857/GG,rs111590482/AG,rs111590482/GG,rs11647828/GG,rs12935810/GG,rs17136707/GG,rs2239310/GG,rs2283497/AA,rs2531967/AA,rs3730119/AA,rs4786454/AA,rs74702385/GA,rs74702385/AA,rs8049452/GG和rs8061182/AA。

3. 权利要求1所述的应用,其中提高的响应基因型是rs1967309/AA和rs12595857/GG的一种或两种。

4. 权利要求1所述的应用,其中提高的响应基因型是rs1967309/AA。

5. 权利要求1-4任一项所述的应用,其中所述心血管事件是冠心病死亡、心脏停搏复苏、非致命性心肌梗死、缺血性起源的非致命性卒中、因不稳定型绞痛住院或未预见的冠状动脉再血管化。

6. 权利要求1-4任一项所述的应用,其中所述受试者被预测受益于达塞曲匹给药。

用于预测对于治疗的响应性的遗传标记

[0001] 发明领域涉及患有心血管病症的受试者的治疗或预防。

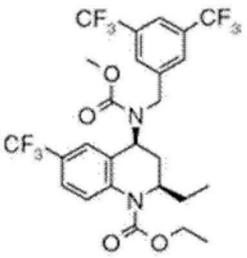
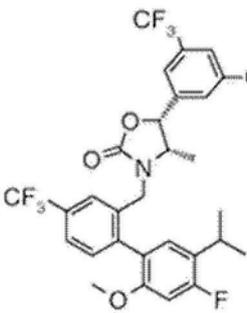
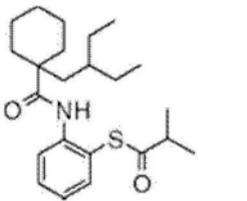
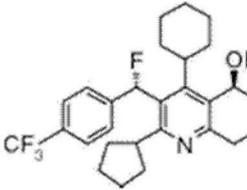
[0002] 尽管20年前一种治疗适合所有是通向强有力的“重磅炸弹”药物所采取的途径。现在,随着人类基因组测序和分子表达谱(molecular profiling)技术的进步,药物开发的途径正采取更具层次化或个体化的途径。这些进步逐渐允许将个体分类为处于特定疾病的风险、响应于特定治疗、不响应于特定治疗或当治疗时处于不良事件的高风险的亚群。因此遗传测试可以用于告知诊断、预后和治疗选择。许多研究已经显示了基因型和对药物治疗的响应之间的关系。这种途径在过去几年已经被广泛接受,尤其是在其中许多个体化药物途径已经被成功开发并且已经提供了临床结果中的大的改进的肿瘤学中。

[0003] 在心血管病症中,对于特定的治疗干预来说,人群按照基因型分层是有限的。本发明的目标之一是证明,罹患心血管病症的人群可能行为不同并且因此可以对特定治疗做出不同的反应。降低LDL是心血管疾病的治疗中的重要治疗策略。实际上,降低LDL的抑制素药物,如可定(Crestor)、立普妥(Lipitor)、普拉固(Pravachol)、和Zocar广泛使用并且是最主要的处方药之一。一段时间内,也已经通常接受的是,在心血管疾病中增加HDL也可以是治疗性的。已经开发了多种药物HDL升高药物,包括:烟酸和CETP抑制剂如托塞曲匹(torcetrapib)、安塞曲匹(anacetrapib)、依塞曲匹(evacetrapib)和达塞曲匹(dalcetrapib)。

[0004] 胆固醇酯转移蛋白(CETP)也被称为血浆脂质转移蛋白是在多个组织中但是主要在肝脏中合成的疏水糖蛋白。CETP促进全血浆脂蛋白粒子之间的胆固醇酯和甘油三酯的双向转移。通过具有CETP遗传缺陷的人中的观察提供了第一证据CETP活性对血浆脂蛋白的影响。在日本1989年确定了第一CETP突变为明显提高的HDL-C的原因。从那时起已经在亚洲人中确定了十个在高加索人中确定了一个与CETP缺陷有关的突变。在日本发现,57%的具有HDL-C>100mg/dL的水平水平的受试者具有CETP基因的突变。此外,37%的具有75-100mg/dL之间的HDL-C的水平水平的日本人具有CETP基因的突变。随后,用抗CETP抗体治疗的动物的研究显示,CETP抑制引起HDL-C的浓度的显著增加。与用抗CETP抗体治疗的CETP缺陷患者和兔子中的这些观察一致,从那时起已经发现,用CETP抑制剂药物治疗人类增加了HDL胆固醇和apoA-I(HDL中主要的载脂蛋白)的浓度。许多流行病学研究已经将CETP活性变化的作用与冠状动脉心脏病风险建立了联系,包括人类突变的研究(Hirano,K.I.Yamishita,S.和Matsuzawa Y(2000)Curr.Opin.Lipido.11(4),389-396)。

[0005] 动脉粥样硬化及其临床后果,包括冠状动脉心脏病(CHD)、卒中和外周血管疾病,在国际上构成了对卫生保健系统的巨大负担。抑制CETP的药物(CETP抑制剂)已经处于开发中一段时间,并且预期的是,它们将会可用于治疗或预防动脉粥样硬化。多种类型的CETP抑制剂药物已经显示在人中增加HDL、降低LDL并且对治疗动脉粥样硬化和心血管疾病具有治疗效果,包括达塞曲匹、托塞曲匹、安塞曲匹、依塞曲匹、BAY 60-5521和其他(表1)。

[0006] 表1:领先的CETP抑制剂药物和临床状态的概述

结构	化合物	临床阶段
[0007] 	托塞曲匹	2006 年 III 期停止
[0008] 	安塞曲匹	III 期
[0008] 	达塞曲匹	2012 年 5 月 III 期试验暂停
	BAY 60-5521	I 期

[0009] 然而,存在这些药物可能不会在所有患者中安全且有效的证据。由于发生了患者的死亡,与单独用阿托伐他汀 (atorvastatin) 治疗的患者相比,向该患者同时施用了托塞曲匹和阿托伐他汀,托塞曲匹的临床试验在III期终止。在这种情况下,由于相对于单独的抑制素缺乏功效,达塞曲匹的临床试验也在III期暂停。在临床试验和稍早阶段的开发中仍然在寻找另外的CETP抑制剂。通常,使用提供更好功效、降低脱靶作用的CETP抑制剂的治疗

策略将会是临床上有益的。需要用于预测对CETP抑制剂的响应并且获取与CETP抑制剂的施用有关的不良事件的风险的生物标记、方法和途径。

[0010] CETP抑制剂可用于治疗和/或预防动脉粥样硬化 (atherosclerosis), 外周血管疾病 (peripheral vascular disease), 异常脂肪血症 (dyslipidemia), 高 β 脂蛋白血症 (hyperbetalipoproteinemia), 低 α 脂蛋白血症 (hypoalphalipoproteinemia), 高胆固醇血症 (hypercholesterolemia), 高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia), 家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia), 心血管病症 (cardiovascular disorder), 绞痛 (angina), 缺血 (ischemia), 心脏缺血 (cardiac ischemia), 卒中 (stroke), 心肌梗死 (myocardial infarction), 再灌注损伤 (reperfusion injury), 血管成形再狭窄 (angioplastic restenosis), 高血压 (hypertension), 以及糖尿病 (diabetes)、肥胖症 (obesity) 或内毒素血症 (endotoxemia) 的血管并发症 (vascular complication)。

[0011] 临床试验具有显示, 患者对利用药物的治疗的响应通常是各种各样的。迫切需要改善药物开发、临床开发和药物对患者中的个体或亚群的治疗影响。SNP可以用于鉴定最适合利用特定药物试剂的治疗的患者 (这通常被称为“药物基因组学”)。类似地, 由于患者产生有毒副作用的增加的可能性或它们不响应于治疗的可能性, SNP可以用于从某些治疗中将患者排除在外。还可以在药物研究中使用药物基因组学以辅助药物开发和选择过程。Linder等人, *Clinical Chemistry* 43:254 (1997); Marshall, *Nature Biotechnology* 15: 1249 (1997); 国际专利申请W0 97/40462, SpectraBiomedical; 和Schafer等人, *Nature Biotechnology* 16:3 (1998)。

[0012] 在最近因急性冠状动脉综合征 (ACS) 住院的稳定CHD患者中, 达塞曲匹死亡和发病试验 (da1-OUTCOMES) 是双盲的、随机化的、安慰剂对照的、平行组、多中心研究。进行研究以测试以下假设: 在最近患有ACS的患者中, 通过经由CETP抑制来升高HDL-C的水平, CETP抑制将会降低复发的心血管事件的风险。合格的患者进入大约4至6周的单盲安慰剂准备阶段, 以使得患者稳定并且完成计划的再血管化 (revascularization) 过程。在准备阶段的末期, 以1:1的比率将稳定状态下的合格患者随机化至600mg的达塞曲匹或安慰剂, 并进行基于证据的用于ACS的医疗护理。达塞曲匹是胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 的抑制剂。已经显示其在多种动物物种和在人中引起CETP活性的与剂量有关的降低以及HDL-C水平的增加。通过不同途径降低CETP活性已经在多种动物模型中显示出抗动脉粥样硬化效果。由于没有效果, 试验在2012年5月由DSMB中断。da1-OUTCOMES (da1-结果) 研究得到了与心血管疾病进展有关的意外的观察。尽管HDL-c明显增加, 治疗中的患者未显示出心血管事件的明显减少并且终止了研究。

[0013] 在终止da1-OUTCOMES研究之后, 假设研究中的患者的亚组对达塞曲匹响应不同并且达塞曲匹可以在患者的亚群中具有明显的治疗效果。为了患者分层和为了治疗选择, 进行da1-OUTCOMES研究人群的药物基因组学研究, 以研究在达塞曲匹响应中的个体间差异并且鉴定用于预测对达塞曲匹、或其他CETP抑制剂的治疗响应的遗传标记。

[0014] 本发明提供用于选择能够受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂、尤其利用CETP抑制剂/调节剂的治疗的个体的基因分型 (genotyping) 方法、试剂和组合物, 尤其是其中该个体患有心血管病症。本发明还提供治疗患有心血管病症的患者方法, 所述方法包括将受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂、尤其利用CETP抑制剂/调节剂的治疗的患者的基因分型和

选择。意外地, dal-OUTCOMES患者群体的药物基因组学研究发现了单核苷酸多态性(SNP), 为与个体对达塞曲匹的响应有关的并且可用于预测对HDL升高剂或HDL模拟剂(特别是CETP抑制剂/调节剂)的治疗响应以及用HDL升高剂或HDL模拟剂(特别是CETP抑制剂/调节剂)治疗患者的遗传标记。

[0015] 在本发明的基因分型方法中检测到的遗传标记包括: 在16号染色体上的9型腺苷酸环化酶(ADCY9)基因中存在的15个SNP、rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119和rs13337675, 特别是rs1967309, 其与对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的响应显著相关($P=4.11 \cdot 10^{-8}$)。

[0016] 本发明的其他基因标记包括ADCY9基因中的SNP, 其与rs1967309处于连锁不平衡或提供具有 $P<0.05$ 的关联信号, 并且可以提供rs1967309的可用的替代生物标记。在一个实施方案中, 检测到由与rs1967309处于连锁不平衡而遗传的SNP组成的替代生物标记, 并且推断出rs1967309的基因型。

[0017] 本发明涉及用HDL升高药物、特别是CETP抑制剂对患者进行基因分型和治疗的方法。在rs1967309处的三种基因型预测个体对HDL升高药物、特别是CETP抑制剂的响应: AA、AG和GG。在这些中, AA基因型与用HDL升高药物治疗的患者中的提高的治疗响应有关, AG基因型与部分响应有关并且GG基因型与缺乏响应(不响应)有关。对于本发明的目的来说: 携带AA基因型的患者可以受益于利用HDL升高药物的治疗; 携带AG基因型的患者可以受益于利用HDL升高药物的治疗并且携带GG基因型的患者不能受益于利用HDL升高药物的治疗。在rs1967309处的两种基因型AA和AG表示在患有心血管病症的患者中对CETP抑制剂、特别是达塞曲匹的治疗响应。具体地, rs1967309的AA基因型表示在患有心血管病症的患者中对CETP抑制剂、特别是达塞曲匹的较大的治疗响应。

[0018] 本发明涉及含有多态性或基因变体的核酸分子, 由这些核酸分子编码的变体蛋白、用于检测多态性核酸分子的试剂, 和使用核酸分子和蛋白的方法以及使用试剂用于它们的检测的方法(例如, 用于在本发明的基因分型方法中使用的引物和探针)。

[0019] 在一个实施方案中, 本发明提供: 检测本发明的基因变体的方法以及用于在这些方法中使用的检测试剂, 如探针或引物。

[0020] 本发明具体提供, 与对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的治疗响应有关的遗传标记, 以及含有本发明的基因变体的合成核酸分子(包括DNA和RNA分子)。本发明还提供由含有这种基因变体的核酸分子编码的变体蛋白, 针对所编码的变体蛋白的抗体, 含有新型基因变体或SNP信息的基于计算机的数据储存系统, 检测试验样品中的这些SNP的方法, 基于存在或不存在一个或多个本发明的基因变体或一个或多个编码的变体产物(例如, 变体mRNA转录物或变体蛋白)的检测来鉴定当施用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂时治疗上响应的个体的方法, 以及治疗携带本发明的基因变体中的一种或多种的患有心血管疾病的个体的方法。

[0021] 本发明的示范性实施方案还提供了用于选择或制定治疗方案的方法(例如, 用于确定是否向个体施用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂治疗的方法)。

[0022] 本发明的多个实施方案还提供用于基于个体的基因型选择可以向其治疗上施用HDL升高剂或HDL模拟剂(特别是CETP抑制剂/调节剂)的个体的方法, 以及用于基于个体的

基因型选择用于参加HDL升高剂或HDL模拟剂(特别是CETP抑制剂/调节剂)的临床试验的个体的方法(例如,基于它们的基因型,尤其是在rs1967309处它们的基因型是AA,选择最可能正向响应的个体参加试验和/或将不大可能对治疗正向响应的个体从试验中排除,或者选择不大可能正向响应的个体参加可以从其中受益的备选药物的临床试验。

[0023] 可以将本发明的核酸分子插入在表达载体中,以在宿主细胞中制备变体蛋白。因此,本发明还提供包含本发明的含SNP的核酸分子的载体,含有该载体的基因改造的宿主细胞,以及用于利用这种宿主细胞表达重组变体蛋白的方法。在另一个具体实施方案中,可以使用宿主细胞、含SNP的核酸分子、和/或变体蛋白作为用于筛选或鉴定治疗剂的方法中的目标,所述治疗剂是HDL升高剂或HDL模拟剂(特别是CETP抑制剂/调节剂)。

[0024] 可以在本文中确定/评价的ADCY9的示例性SNP提供了用于鉴定对达塞曲匹的提高了的响应的方法,所述方法是这样的:如在SEQ. ID. NO. 1和2中所示,其中突变引起在位置4,062,592和4,065,583(基因组组件GRCh37.p5)处的核苷酸序列的改变,其也被分别称为具有标识符rs12595857和rs1967309的单核苷酸多态性。

[0025] 本发明基于遗传多态性的鉴定,所述遗传多态性预测利用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的治疗将会使患有心血管病症的患者受益的增加的可能性。

[0026] 图1:本发明的SNP rs1967309和rs12595857与用CETP抑制剂达塞曲匹治疗的患者中的心血管事件(主要复合事件或未预见的冠状动脉再血管化)的减少显著相关。该图示出了关于来自dal-OUTCOMES研究的治疗组的样品的全基因组关联研究(GWAS)的结果。A图示出了关于在16号染色体上的ADCY9基因区中强信号的逻辑回归的Manhattan图表。每个点表示用于比较在治疗期间经历心血管事件的参与者与未经历心血管事件的那些参与者的P值,其针对性别和遗传血统的5个主要成分调节。B图示出了ADCY9区中单核苷酸多态性(SNP)的P值。在治疗期间的心血管事件与rs1967309SNP和与rs1967309处于连锁不平衡的相邻的SNPrs12595857之间存在强的关联。x轴示出了在16号染色体上的SNP位置(国家生物技术信息中心,组件GRCh37.p5)。左边的y轴示出了如在A图中描述的用于心血管事件与无事件之间的比较的P值的负 \log_{10} 。右边的y轴示出了在16号染色体上的重组率。菱形示出了如根据来自HapMap的参比CEU样品估算的样品中的连锁不平衡度(LD)。

[0027] 图2:分别根据达塞曲匹和安慰剂治疗组的研究终止并且根据ADCY9基因中的rs1967309基因型的心血管事件(dal-OUTCOMES主要复合事件或未预见的冠状动脉再血管化)的频率。事件的百分数以95%CI报告。

[0028] 图3:分别针对达塞曲匹治疗组和安慰剂组并且通过在ADCY9基因中的rs1967309SNP处的三种基因型(GG、AG、AA)分层的心血管事件(dal-OUTCOMES主要复合事件或未预见的冠状动脉再血管化)的累积发病率。

[0029] 图4:示出了根据24个月的治疗期间的基因型的脂质水平的变化。A图。根据达塞曲匹治疗组的ADCY9SNP rs1967309的基因型组的从基线到1个月的脂质值的变化平均值 \pm SE(mg/dL)。示出P值用于脂质的变化与基因型之间的单变量统计。B图。治疗组中患者的dal-OUTCOMES试验的后续阶段期间LDL胆固醇的绝对值的平均值 \pm 95%CI。P值用于多变量混合回归模型。

[0030] 图5:示出根据来自dal-Outcomes的遗传研究的6297名个体以及来自1000基因组数据组的83CEU祖先(founder)、186JPT-CHB和88YRI祖先的76,854个SNP的前两个维度(C1、

C2)的MDS图表。

[0031] 图6:通过根据来自dal-Outcomes的遗传研究的6297名个体以及来自1000基因组数据组的83CEU祖先、186JPT-CHB和88YRI祖先的76,854个SNP的主要组件分析中的前十个成分解释的累积方差的图表。

[0032] 图7:观察的 $-\log_{10}P$ 值相对于 $MAF \geq 0.05$ 的SNP的全基因组关联的在零假设下的期望的分位数-分位数(QQ)图表。阴影区域是通过计算在零假设下的分布的第2.5和第97.5百分位数而形成的95%集中带。点表示来自PLINK中的逻辑回归的分级的(rank)P值,其用于比较在治疗期间经历心血管事件的治疗组中的dal-Outcomes参与者与未经历心血管事件的那些参与者,并且针对性别和遗传血统的5个主要成分调节。

[0033] 图8:示出在显著相关的SNP rs1967309周围的ADCY9基因的连锁不平衡方式(r^2)的热图。区块6、7、8和9示出了与rs1967309处于高度连锁不平衡的区域,其横跨SNP rs12935810到SNP rs13337675的位置chr16:4049365到chr16:4077178(组件GRCh37/hg19)。

[0034] 在本文中公开了本发明的各种特征和实施方案,然而基于所提供的教导,对于相关领域的技术人员来说本发明的其他特征、修改和等同物将会是显而易见的。所描述的发明不限于所提供的实例和实施方案,各种替代方案、等同物将会被本领域技术人员理解。如在本文中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数,除非上下文明确地另外指出。例如,“一个”细胞也将会包括“多个细胞”。

[0035] “等位基因”被定义为给定的基因的任何一个或多个备选形式。在二倍体细胞或生物中,等位基因对的成员(即给定的基因的两个等位基因)占据一对同源染色体上的相应位置(基因座),并且就特定的基因而言,如果这些等位基因是遗传学上相同的,则该细胞或生物被称为“纯合的”,但是如果是遗传学上不同的,则该细胞或生物被称为“杂合的”。

[0036] “基因”是位于特定染色体上的特定位置的核苷酸的有序序列,其编码特定的功能产物并且可以包括与编码区邻接的不翻译和不转录的序列。这种非编码序列可以含有序列的转录和翻译所需的调节序列或内含子等,或者可以另外具有由于它们超越目标SNP的存在任何功能。

[0037] “基因分型”是指个体在基因组中的一个或多个位置所携带的遗传信息的确定。例如,基因分型可以包括个体因一个SNP而携带一个等位基因或多个等位基因的确定或者个体因多个SNP而携带一个等位基因或多个等位基因的确定。例如,在rs1967309,在一些个体中核苷酸可以是A,并且在其他个体中可以是G。那些在该位置具有A的个体具有A等位基因并且具有G的那些具有G等位基因。在二倍体生物中,个体将具有两个拷贝的含有多态性位置的序列,因此个体可以具有A等位基因和G等位基因,或者备选地,两个拷贝的A等位基因或两个拷贝的G等位基因。那些具有两个拷贝的G等位基因的个体是G等位基因纯合的,那些具有两个拷贝的A等位基因的个体是A等位基因纯合的,并且那些具有一个拷贝的每种等位基因的个体是杂合的。等位基因通常被称为A等位基因,其通常是主要的等位基因,以及B等位基因,其通常是次要的等位基因。基因型可以是AA(纯合A)、BB(纯合B)或AB(杂合的)。基因分型方法通常提供样品作为AA、BB或AB的鉴定。

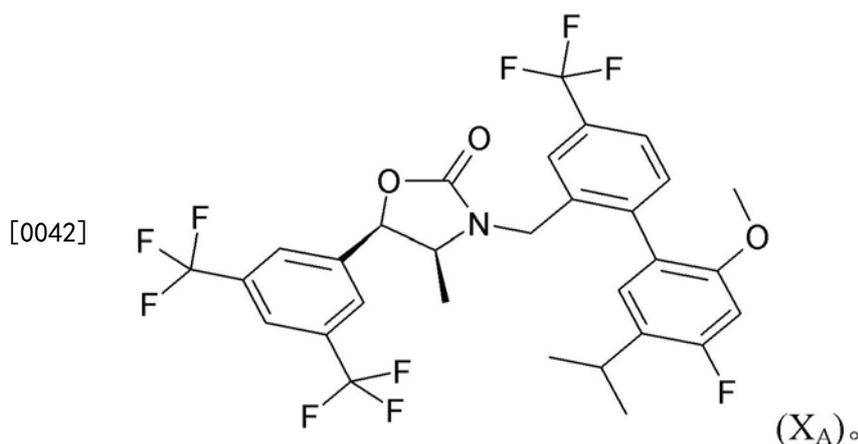
[0038] 术语“包括”意指组合物和方法包括所述的要素,但是并不排除其他要素。

[0039] “HDL升高剂或HDL模拟剂”是指通过以下机制之一增加HDL水平的化合物:CETP抑

制/调节、PPAR激动、LXR激动、HM74激动(烟酸受体)促甲状腺素激素受体激动、脂酶的抑制剂和HDL分解代谢ApoA1诱导物,提供至少一种HDL防动脉粥样硬化(athero-protective)活性的化合物如将会增加细胞脂质流出(胆固醇和/或磷脂)的化合物,具有抗氧化和抗炎活性的化合物。具体地,HDL模拟剂ApoA1和ApoA1衍生物(如apoA1 Milano、ApoA1 Paris)和其他类似物、重构的含有HDL的ApoA1和或ApoAII以及适合的脂质如磷脂。两亲性脂蛋白的ApoE、衍生物、类似物、和模拟肽。“HDL升高剂或HDL模拟剂”的实例是烟酸、贝特类、格列酮、达塞曲匹、安塞曲匹、依塞曲匹、DEZ-001(以前被称为TA-8995)(Mitsubishi Tanabe Pharma)、ATH-03(Affris)、DRL-17822(Dr.Reddy's)、DLBS-1449(Dexa Medica)、RVX-208(Resverlogix)、CSL-112(Cls Behring)、CER-001(Cerenis)、ApoA1-Milnana(Medicine Company)。“HDL升高剂或HDL模拟剂”的具体实例是烟酸、贝特类、格列酮、达塞曲匹、安塞曲匹、依塞曲匹、托塞曲匹,优选烟酸、贝特类、格列酮、达塞曲匹、安塞曲匹或依塞曲匹。更具体地,HDL升高剂或模拟剂选自CETP抑制剂/调节剂。CETP抑制剂/调节剂的实例是达塞曲匹、安塞曲匹、依塞曲匹、DEZ-001(以前被称为TA-8995)(Mitsubishi Tanabe Pharma)、ATH-03(Affris)、DRL-17822(Dr.Reddy's)、DLBS-1449(Dexa Medica)。更具体地,CETP抑制剂/调节剂的实例是达塞曲匹、安塞曲匹、依塞曲匹和托塞曲匹,优选达塞曲匹、安塞曲匹和依塞曲匹。最具体地,根据本发明的HDL升高剂或模拟剂将会是指CETP抑制剂/调节剂,尤其是当CETP抑制剂/调节剂是达塞曲匹时。

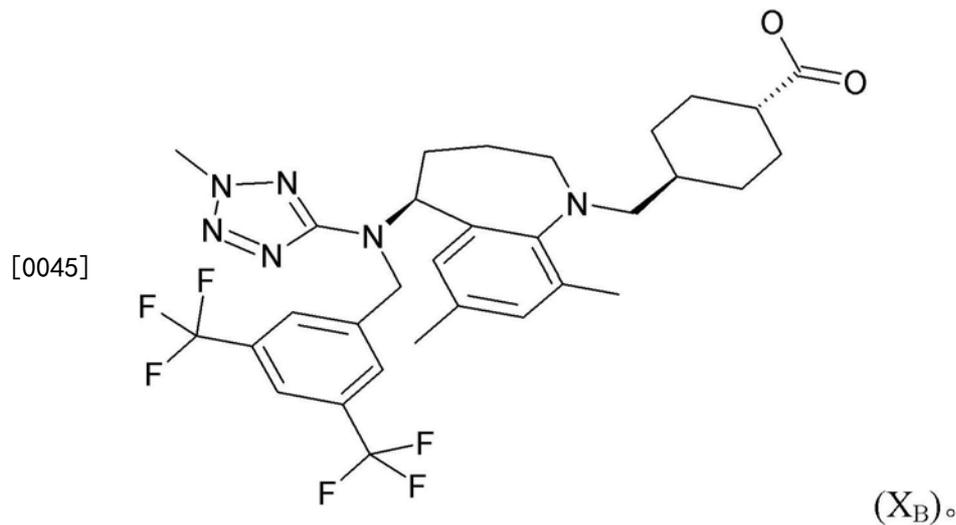
[0040] “CETP抑制剂/调节剂”是指通过抑制CETP和/或一旦与CETP多肽结合即诱导CETP多肽的构象变化来降低CETP活性(通过标准转移测定评估的)的化合物。CETP多肽的CETP构象变化允许在HDL粒子之间形成CETP活性并且通过增加初生前BHDL形成的制备而增加其再循环/转换。优选地,CETP抑制剂/调节剂是指将会与CETP多肽的半胱氨酸13结合的所有化合物。更优选地,“CETP抑制剂/调节剂”选自S-[2-[1-(2-乙基丁基)环己基羰基氨基]-苯基]2-甲基硫代丙酸酯、1-(2-乙基-丁基)-环己烷甲酸(2-巯基-苯基)-酰胺和或双[2-[1-(2-乙基丁基)环己基羰基氨基]苯基]二硫化物。最优选地,“CETP抑制剂/调节剂”是作为前药的S-[2-[1-(2-乙基丁基)环己基羰基氨基]-苯基]2-甲基硫代丙酸酯或作为其活性代谢物的1-(2-乙基-丁基)-环己烷甲酸(2-巯基-苯基)-酰胺。

[0041] “安塞曲匹”是指((4S,5R)-5-[3,5-双(三氟甲基)苯基]-3-{[4'-氟-2'-甲氧基-5'-(丙-2-基)-4-(三氟甲基)[1,1'-联苯基]-2-基]甲基}-4-甲基-1,3-噁唑啉-2-酮,其也被称为MK 0859、CAS 875446-37-0或式(X_A)的化合物。



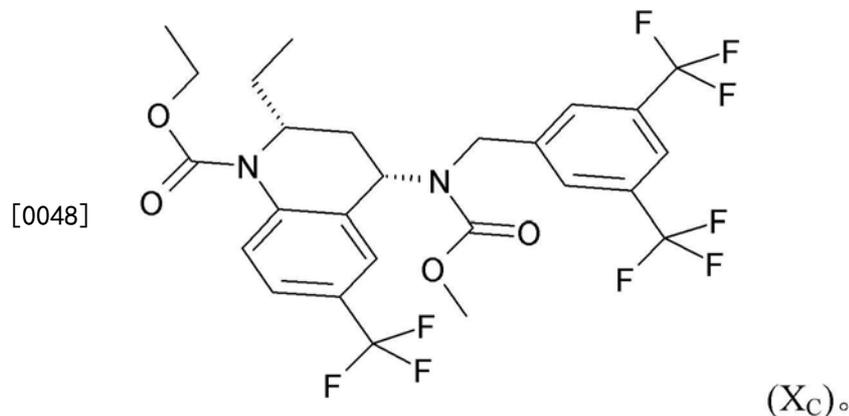
[0043] 在W02006/014413、W02006/014357、W02007005572中描述了安塞曲匹以及制造和使用该化合物的方法。

[0044] “依塞曲匹”是指反式-4-({(5S)-5-[[3,5-双(三氟甲基)苯基]甲基}(2-甲基-2H-四唑-5-基)氨基)-7,9-二甲基-2,3,4,5-四氢-1H-苯并氮草-1-基)甲基)环己烷甲酸,其也被称为LY2484595、CAS1186486-62-3或式(X_B)的化合物



[0046] 在W02011002696中描述了依塞曲匹以及制造和使用该化合物的方法。

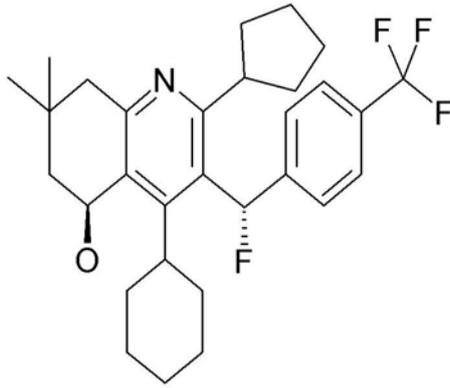
[0047] “托塞曲匹”是指(2R,4S)-4-[(3,5-双三氟甲基苄基)甲氧基羰基氨基]-2-乙基-6-三氟甲基-3,4-二氢-2H-喹啉-1-羧酸乙酯,其也被称为CP-529,414、CAS 262352-17-0或式(X_C)的化合物



[0049] 在W00017164或W00140190中描述了托塞曲匹以及制造和使用该化合物的方法。

[0050] “BAY 60-5521”是指(5S)-5-喹啉醇,4-环己基-2-环戊基-3-[(S)-氟[4-(三氟甲基)苯基]甲基]-5,6,7,8-四氢-7,7-二甲基-,其也被称为CAS 893409-49-9或式(X_D)的化合物

[0051]

(X_D)。

[0052] 在W02006063828中描述了BAY 60-5521以及制造和使用该化合物的方法。

[0053] “治疗”是指治疗性处理和预防性或预防措施。需要治疗的那些包括已经患有病症的那些以及要预防或延缓病症的那些。

[0054] 术语“多态性”、“多态位点”多态性位点”或“单核苷酸多态性位点”(SNP位点)或“单核苷酸多态性”是指在人群中变化的基因的序列中的位置。多态性是在人群中在基因“等位基因”内存在两种以上形式的基因或位置,其频率使得不能仅通过突变来解释最罕见形式的存在。优选的多态性位点具有至少两个等位基因。暗示着多态性等位基因对宿主赋予了一些表现型可变性。多态性可以在基因的编码区域和非编码区域二者中出现。多态性可以在单核苷酸位点出现或者可以包括插入或缺失。可以通过其在染色体上的基因中的核苷酸位置,或者通过在转录因子(transcriptor)上由核苷酸多态性改变的氨基酸来确定这种多态性的位置。单个的多态性还被指定为唯一的标识符(“Reference SNP”、“refSNP”或“rs#”),其对于本领域技术人员来说是已知的,并且例如在可在NCBI网站上获得的核苷酸序列变化的单核苷酸多态性数据库(dbSNP)中使用。

[0055] 术语“连锁不平衡”或“处于连锁不平衡”或“LD”是指在一组个体中等位基因的非随机关联,换句话说这是特定的多态性形式与在不同染色体位置的另一种多态性形式的比预期偶然更频繁的优先分离。相反,以预期频率共同存在的等位基因据称处于“连锁平衡”。

[0056] “rs”前缀是指在NCBI SNP数据库<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term>找到的数据库中的SNP。“rs”数字是NCBI rsSNP ID形式。

[0057] 术语“样品”包括任何从患者或个体获取的生物样品,包括细胞、组织样品或体液。例如,样品可以包括皮肤样品、脸颊细胞样品、唾液或血细胞。样品可以包括,但不限于,单种细胞、多种细胞、细胞片段、试样量的体液、全血、血小板、血清、血浆、红细胞、白细胞、内皮细胞、活组织检查材料、滑液和淋巴液。具体地,“样品”是指血细胞。

[0058] 术语“治疗剂”是指能够治疗或预防心血管病症的试剂。如在本文中所使用的,“能够治疗或预防心血管病症”的试剂是指能够治疗和/或预防人中和/或所述心血管病症的细胞或动物模型中的心血管病症的分子。

[0059] 如在本文中所使用的“提高的响应多态性”、“提高的响应基因型”或“响应性基因型”是指在如在本文中所描述的ADCY9基因中的一个或多个多态性位点处的等位基因变体或基因型(例如,rs1967309/AA),与预测受试者将会较差地响应于HDL升高剂或HDL模拟剂施用的等位基因变体或基因型或多态性(例如,rs1967309/AG或rs1967309/GG)相比,其预测受试者将会治疗上响应并且受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂的治疗(可以通过降低心

血管事件的数量来测量)。可以通过心血管事件的数量相对于具有“提高的响应基因型”的受试者的相对增加来测量“降低的响应”、“部分响应”、“不响应”或“缺乏治疗功效”。备选地,可以通过心血管事件的数量相对于携带与对HDL升高剂或HDL模拟剂“不响应”或“部分响应”有关的多态性的受试者的相对降低来测量“提高的响应”、“响应物”或“治疗功效”。具体地,rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG、rs8061182/AA是提高的响应基因型。更具体地,rs1967309/AA是提高的响应基因型。

[0060] 如在本文中所使用的“心血管事件”是指心血管死亡、非致命性心肌梗死(MI)、缺血性起源的非致命性卒中、因不稳定型绞痛住院和冠状动脉再血管化。

[0061] 如在本文中所使用的“寡核苷酸”是可变长度的核酸或多核苷酸。这种寡核苷酸可以用作探针、引物,并且用于制造用于特定核酸的检测和/或扩增的微阵列(阵列)。这种DNA或RNA链可以通过将活性单体连续添加(5'-3'或3'-5')至可以与不溶性载体连接的增长链来合成。在本领域中已知许多方法用于合成用于随后的单独用途或用作不溶性载体的一部分的寡核苷酸,例如在阵列中(BERNFIELD MR.和ROTTMAN FM.J.Biol.Chem.(1967) 242(18):4134-43;SULSTON J.等人PNAS(1968) 60(2):409-415;GILLAM S.等人NucleicAcidRes.(1975) 2(5):613-624;BONORA GM.等人NucleicAcidRes.(1990) 18(11):3155-9;LASHKARI DA.等人PNAS(1995) 92(17):7912-5;MCGALL G.等人PNAS(1996) 93(24):13555-60;ALBERT TJ.等人Nucleic Acid Res.(2003) 31(7):e35;GAO X.等人Biopolymers(2004) 73(5):579-96;和MOORCROFT MJ.等人Nucleic Acid Res.(2005) 33(8):e75)。通常,通过在取决于所使用的方法的各种条件下分步添加活性且受保护的单体来合成寡核苷酸。随后,可以移除特定的保护基以允许进一步延伸,并且随后,一旦合成完成,即可以移除所有保护基并且从其固体载体中移除寡核苷酸用于完整链的纯化(如果需要的话)。

[0062] 术语“基因型”是指生物的遗传构成,通常是就与特定上下文相关的一个基因或一些基因或基因区域(即负责特定表现型的遗传基因座)而言。具体地,在基因中给定位置的等位基因的特定组合,如例如,基因型AA、AG、或GG,它们是rs1967309SNP的可能的基因型。

[0063] “表现型”被定义为生物的可观察到的特征。表1以表示对利用HDL升高剂或HDL模拟剂的心血管病症的治疗的响应性的指征的数值示出了ADCY9SNP的基因型相关性。

[0064] 如在本文中所使用的术语“生物标记”是指特定的变体等位基因(多态性位点,如SNP)或野生型等位基因。的序列特征。生物标记也指由特定变体或野生型等位基因编码的肽或表位。

[0065] 如在本文中所使用的术语“替代标记”是指遗传变体,包括SNP,其处于与本发明的提高的响应基因型、特别是rs1967309AA的连锁不平衡中而存在。

[0066] 如在本文中所使用的术语“遗传标记”是指与对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的响应有关的特定基因的多态性位点的变体。具体地,如在本文中所使用的“遗传标记”是指与对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的响应有关的ADCY9基因中的多态性位点的变体。

[0067] 在本文中所描述的某些方法中,使用一种或多种生物标记鉴定或选择将受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的治疗的个体。用于在本发明中使用

的SNP生物标记可以预测对治疗的治疗响应(R)或对治疗的不响应(NR)。表2示出了在dal-
Outcomes群体中观察到的、在多态性位点rs1967309存在的基因型,其可以用作生物标记以
预测对达塞曲匹或HDL升高剂或HDL模拟剂、具体对其他CETP抑制剂/调节剂的响应。表2或3
中所示的每种基因型可以单独或与在其他多态性位点的基因型组合用作生物标记以预测
对HDL升高剂或HDL模拟剂、具体对CETP抑制剂/调节剂)的响应。

[0068] 表2:遗传标记和预测的对利用HDL升高剂或HDL模拟剂的治疗的响应

[0069]

SNP	基因型	对治疗的响应性
rs1967309	AA	R
rs1967309	AG	PR
rs1967309	GG	NR

[0070] R: 响应

[0071] PR: 部分响应

[0072] NR: 不响应

[0073] 表3:遗传标记和预测的对利用HDL升高剂或HDL模拟剂的治疗的响应

[0074]

SNP	基因型	对治疗的响应性
rs12595857	AA	NR
rs12595857	AG	PR
rs12595857	GG	R

[0075] R: 响应

[0076] PR: 部分响应

[0077] NR: 不响应

[0078] 表4:遗传标记和预测的对利用HDL升高剂或HDL模拟剂的治疗的响应

[0079]

SNP	基因型	对治疗的响应性
rs111590482	AA	NR
	AG	R
	GG	R
rs11647828	AA	NR
	AG	PR
	GG	R
rs12935810	GG	R
	GA	NR
	AA	NR

[0080]

rs13337675	AA	NR
	AG	PR
	GG	PR
rs17136707	AA	NR
	AG	PR
	GG	R
rs2239310	AA	NR
	AG	PR
	GG	R
rs2283497	CC	NR
	CA	PR
	AA	R
rs2531967	GG	NR
	GA	PR
	AA	R
rs3730119	GG	NR
	GA	PR
	AA	R
rs4786454	GG	NR
	GA	PR
	AA	R
rs74702385	GG	NR
	GA	R
	AA	R
rs8049452	GG	R
	GA	PR
	AA	NR
rs8061182	AA	R
	AG	PR
	GG	NR

[0081] R: 响应

[0082] PR: 部分响应

[0083] NR: 不响应

[0084] rs1967309和rs12595857二者均位于与具有对ADCY9基因表达的调控活性一致的区域中的ADCY9基因的内含子(非编码)区。

[0085] 在本文中所描述的某些方法中, 鉴定并选择将会对利用HDL升高剂或HDL模拟剂、尤其利用CETP抑制剂/调节剂的治疗治疗上响应的个体, 以用于使用本发明的基因分型方法治疗。具体地, 选择携带以下提高的响应基因型中的一种或多种的患者用于本发明的方法中的治疗: rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/

GG、rs8061182/AA。更具体地,选择携带rs12595857/GG或rs1967309/AA基因型的患者用于在本发明的方法中的治疗:最具体地,选择携带rs1967309/AA基因型的患者用于在本发明的方法中的治疗:

[0086] 在另一个实施方案中,本发明提供用于鉴定受益于HDL升高剂或HDL模拟剂的受试者的方法,所述方法包括确定所述受试者在ADCY9基因中多态性位点中的一个或多个处的基因型(例如,基因分型)。

[0087] 在另一个实施方案中,本发明提供用于确定个体对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂的响应性的方法,所述方法包括使用一种或多种在本文中所公开的引物或探针确定所述受试者在下列各项中的一个或多个处的基因型(例如,基因分型):rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448。

[0088] 在另一个实施方案中,本发明提供用于确定个体对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂的响应性的方法,所述方法包括使用一种或多种在本文中所公开的引物或探针确定所述受试者在下列各项中的一个或多个处的基因型(例如,基因分型):rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967或rs3730119、rs13337675。

[0089] 在具体的实施方案中,本发明提供在本文中描述的方法,其中多态性位点包括选自由下列组成的组的以下位点中的一个或多个:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448,具体地,其中多态性位点选自由下列组成的组:rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119和rs13337675,更具体地,其中多态性位点是rs1967309或rs12595857,更具体地,其中多态性位点是rs1967309,具体地,其中相应的基因型包括AA。

[0090] 在具体的实施方案中,本发明提供将选自由下列组成的组的一个或多个多态性位点基因分型的方法:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448,具体地,其中多态性位点选自由下列组成的组:rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119和rs13337675,更具体地,其中多态性位点是rs1967309或rs12595857,更具体地,其中多态性位点是rs1967309。

[0091] 在具体的实施方案中,本发明提供一种方法,其中携带下列各项中的一个或多个的受试者受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂的治疗:rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG、rs8061182/AA,具体地,其中HDL升高剂或HDL模拟剂是

CETP抑制剂/调节剂,并且更具体地,其中HDL升高剂或HDL模拟剂是S-(2-{[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基}-苯基)酯。在具体的实施方案中,本发明提供其中将HDL升高剂或HDL模拟剂施用于比如受试者的方法。

[0092] 在具体的实施方案中,本发明提供一种方法,其中利用HDL升高剂或HDL模拟剂治疗携带下列各项中的一个或多个的受试者:rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG、rs8061182/AA,具体地,其中HDL升高剂或HDL模拟剂是CETP抑制剂/调节剂,并且更具体地,其中HDL升高剂或HDL模拟剂是S-(2-{[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基}-苯基)酯。

[0093] 在具体的实施方案中,本发明提供一种方法,其中受试者患有心血管病症,具体地,其中心血管病症选自由下列组成的组:哺乳动物中的动脉粥样硬化(atherosclerosis),外周血管疾病(peripheral vascular disease),异常脂肪血症(dyslipidemia),高 β 脂蛋白血症(hyperbetalipoproteinemia),低 α 脂蛋白血症(hypoalphalipoproteinemia),高胆固醇血症(hypercholesterolemia),高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia),家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia),绞痛(angina),缺血(ischemia),心脏缺血(cardiac ischemia),卒中(stroke),心肌梗死(myocardial infarction),再灌注损伤(reperfusion injury),血管成形再狭窄(angioplastic restenosis),高血压(hypertension),以及糖尿病(diabetes)、肥胖症(obesity)或内毒素血症(endotoxemia)的血管并发症(vascular complication),更具体地,其中心血管病症选自由下列组成的组:心血管疾病(cardiovascular disease)、冠状动脉心脏病(coronary heart disease)、冠状动脉疾病(coronary artery disease)、低 α 脂蛋白血症(hypoalphalipoproteinemia)、高 β 脂蛋白血症(hyperbetalipoproteinemia)、高胆固醇血症(hypercholesterolemia)、高脂血症(hyperlipidemia)、动脉粥样硬化(atherosclerosis)、高血压(hypertension)、高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia)、高脂蛋白血症(hyperlipidoproteinemia)、外周血管疾病(peripheral vascular disease)、心绞痛(angina)、缺血(ischemia)、和心肌梗死(myocardial infarction)。

[0094] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗需要其的受试者中的心血管病症的方法,所述方法包括:

[0095] (a) 选择在以下位点中的一个或多个处具有提高的响应基因型的受试者:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448;

[0096] (b) 向所述受试者施用HDL升高剂或HDL模拟剂,特别是CETP抑制剂/调节剂。

[0097] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗需要其的受试者中的心血管病症的方法,所述方法包括:

[0098] (a) 选择在以下位点中的一个或多个处具有提高的响应基因型的受试者:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、

rs13337675:

[0099] (b) 向所述受试者施用HDL升高剂或HDL模拟剂,特别是CETP抑制剂/调节剂。

[0100] 在具体的实施方案中,本发明提供一种治疗需要其的受试者中的心血管病症的方法,所述方法包括:

[0101] (a) 选择在在rs1967309处具有提高的响应多态性的受试者,具体地,其中受试者在rs1967309处具有AA基因型;

[0102] (b) 向所述受试者施用HDL升高剂或HDL模拟剂,特别是CETP抑制剂/调节剂。

[0103] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗需要其的受试者中的心血管病症的方法,所述方法包括:

[0104] (a) 在以下位点中的一个或多个处将受试者基因分型:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448;

[0105] (b) 向所述受试者施用HDL升高剂或HDL模拟剂,特别是CETP抑制剂/调节剂。

[0106] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗需要其的受试者中的心血管病症的方法,所述方法包括:

[0107] (c) 在以下位点中的一个或多个处将受试者基因分型:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675:

[0108] (d) 向所述受试者施用HDL升高剂或HDL模拟剂,特别是CETP抑制剂/调节剂。

[0109] 本发明还提供一种治疗患者的方法,所述方法包括:

[0110] a. 针对选自由下列组成的组的一种或多种遗传标记的存在分析患者样品:rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG和rs8061182/AA并且

[0111] b. 利用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂治疗携带所述遗传标记中的一种或多种的患者。

[0112] 在具体的实施方案中,本发明提供其中在选自rs1967309、rs12595857中的一个或多个处确定基因型的方法。

[0113] 具体地,确定个体对HDL升高药物的响应性的方法包括:

[0114] a. 从个体获得样品,其中样品包含遗传物质;

[0115] b. 使样品与试剂接触,生成试剂和选自表7的遗传标记之间的复合物;

[0116] c. 检测复合物以获得与样品有关的数据组并且

[0117] d. 分析数据组以确定存在或不存在遗传标记。

[0118] 在所提供的基因分型方法中生成的试剂和遗传标记之间的复合物可以通过聚合酶链式反应(PCR)或DNA测序生成。

[0119] 本发明提供用于将选自由下列组成的组的遗传标记基因分型的试剂:rs12595857/GG;rs1967309/AA;rs111590482/AG;rs111590482/GG;rs11647828/GG;rs12935810/GG;rs17136707/GG;rs2239310/GG;rs2283497/AA;rs2531967/AA;rs3730119/

AA;rs4786454/AA;rs74702385/GA;rs74702385/AA;rs8049452/GG;rs8061182/AA;rs1967309/GA、rs12595857/AG、rs13337675/AG、rs13337675/GG、rs17136707/AG、rs2239310/AG、rs2283497/CA、rs2531967/GA、rs3730119/GA、rs4786454/GA、rs8049452/GA、rs8061182/AG、rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG、rs8061182/AA、rs12935810/GA、rs12935810/AA、rs11647828/AA、rs2531967/GG、rs3730119/GG、rs2239310/AA、rs12595857/AA、rs111590482/AA、rs74702385/GG、rs1967309/GG、rs2283497/CC、rs8061182/GG、rs17136707/AA、rs8049452/AA、rs4786454/GG、rs13337675/AA和rs11647828/AG,特别是引物或探针。

[0120] 在具体的实施方案中,引物包含DNA链,其长度为15至30个核苷酸并且在高严格性条件下与16号染色体的邻接下列各项的区域杂交:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448。

[0121] 在具体的实施方案中,引物包含DNA链,其长度为15至30个核苷酸并且在高严格性条件下与16号染色体的邻接下列各项的区域杂交:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119或rs13337675。

[0122] 在另一个实施方案中,试剂是包含DNA链的引物,其长度为15至30个核苷酸并且在高严格性条件下与16号染色体的与下列各项重叠的区域杂交:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448。

[0123] 在另一个实施方案中,试剂是包含DNA链的引物,其长度为15至30个核苷酸并且在高严格性条件下与16号染色体的与下列各项重叠的区域杂交:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119或rs13337675。

[0124] 在另一个实施方案中,探针包含长度为15至30个核苷酸并且在高严格性条件下与16号染色体的与下列各项重叠的区域杂交:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675、rs12920508、rs12599911、rs2531971或rs2238448。

[0125] 在另一个实施方案中,探针包含长度为15至30个核苷酸并且在高严格性条件下与16号染色体的与下列各项重叠的区域杂交:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119或rs13337675。

[0126] 在另一个实施方案中,探针包含长度为15至30个核苷酸并且在高严格性条件下与选自SEQ.ID.NO.1至SEQ.ID.NO.15的寡核苷酸杂交。

[0127] 在具体的实施方案中,本发明提供其中HDL升高剂或HDL模拟剂是CETP抑制剂/调节剂的方法,具体地,其中HDL升高剂或HDL模拟剂是S-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯。

[0128] 在又一个实施方案中,本发明提供HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂在制备用于治疗心血管病症的药物中的用途,其中受试者在以下位点中的一个或多个处具有提高的响应基因型:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119或rs13337675。

[0129] 在具体的实施方案中,本发明提供如在本文中定义的用途,其中被治疗的受试者在rs1967309处具有提高的响应多态性。

[0130] 在另一个实施方案中,本发明提供一种HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂,所述HDL升高剂或HDL模拟剂用于治疗心血管病症,其中被治疗的受试者携带选自下列各项中的一种或多种遗传标记:rs12595857/GG;rs1967309/AA;rs111590482/AG;rs111590482/GG;rs11647828/GG;rs12935810/GG;rs17136707/GG;rs2239310/GG;rs2283497/AA;rs2531967/AA;rs3730119/AA;rs4786454/AA;rs74702385/GA;rs74702385/AA;rs8049452/GG;rs8061182/AA;rs1967309/GA、rs12595857/AG、rs13337675/AG、rs13337675/GG、rs17136707/AG、rs2239310/AG、rs2283497/CA、rs2531967/GA、rs3730119/GA、rs4786454/GA、rs8049452/GA、rs8061182/AG、rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG、rs8061182/AA、rs12935810/GA、rs12935810/AA、rs11647828/AA、rs2531967/GG、rs3730119/GG、rs2239310/AA、rs12595857/AA、rs111590482/AA、rs74702385/GG、rs1967309/GG、rs2283497/CC、rs8061182/GG、rs17136707/AA、rs8049452/AA、rs4786454/GG、rs13337675/AA和rs11647828/AG。

[0131] 在具体的实施方案中,本发明提供HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂,所述HDL升高剂或HDL模拟剂用于治疗心血管病症,其中受治疗的受试者携带提高的响应基因型rs1967309。在具体的实施方案中,本发明提供如在本文中定义的HDL升高剂或HDL模拟剂,其中基因型是AA。

[0132] 在具体的实施方案中,本发明提供如在本文中描述的HDL升高剂或HDL模拟剂,其中心血管病症选自由下列组成的组:哺乳动物中的动脉粥样硬化(atherosclerosis),外周血管疾病(peripheral vascular disease),异常脂肪血症(dyslipidemia),高 β 脂蛋白血症(hyperbetalipoproteinemia),低 α 脂蛋白血症(hypoalphalipoproteinemia),高胆固醇血症(hypercholesterolemia),高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia),家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia),绞痛(angina),缺血(ischemia),心脏缺血(cardiac ischemia),卒中(stroke),心肌梗死(myocardial infarction),再灌注损伤(reperfusion injury),血管成形再狭窄(angioplastic restenosis),高血压(hypertension),以及糖尿病(diabetes)、肥胖症(obesity)或内毒素血症(endotoxemia)的血管并发症(vascular complication)。

[0133] 在具体的实施方案中,本发明提供如在本文中描述的HDL升高剂或HDL模拟剂,其

中心血管病症选自由下列组成的组：心血管疾病 (cardiovascular disease)、冠状动脉心脏病 (coronary heart disease)、冠状动脉疾病 (coronary artery disease)、低 α 脂蛋白血症 (hypoalphalipoproteinemia)、高 β 脂蛋白血症 (hyperbetalipoproteinemia)、高胆固醇血症 (hypercholesterolemia)、高脂血症 (hyperlipidemia)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis)、高血压 (hypertension)、高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia)、高脂蛋白血症 (hyperlipidoproteinemia)、外周血管疾病 (peripheral vascular disease)、心绞痛 (angina)、缺血 (ischemia)、和心肌梗死 (myocardial infarction)。

[0134] 在具体的实施方案中,本发明提供如在本文中描述的HDL升高剂或HDL模拟剂,其中HDL升高剂或模拟剂是HDL升高剂,特别是CETP抑制剂/调节剂,更特别是-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯。

[0135] 在另一个实施方案中,本发明提供用于治疗携带提高的响应基因型的患有心血管病症的患者的S-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯,具体地,其中基因型是rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG或rs8061182/AA,更具体地,其中基因型是rs1967309/AA。

[0136] 在具体的实施方案中,本发明提供用于治疗携带提高的响应基因型的患有心血管病症的患者的S-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯,其中心血管病症选自由下列组成的组：哺乳动物中的动脉粥样硬化 (atherosclerosis),外周血管疾病 (peripheral vascular disease),异常脂肪血症 (dyslipidemia),高 β 脂蛋白血症 (hyperbetalipoproteinemia),低 α 脂蛋白血症 (hypoalphalipoproteinemia),高胆固醇血症 (hypercholesterolemia),高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia),家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia),绞痛 (angina),缺血 (ischemia),心脏缺血 (cardiac ischemia),卒中 (stroke),心肌梗死 (myocardial infarction),再灌注损伤 (reperfusion injury),血管成形再狭窄 (angioplastic restenosis),高血压 (hypertension),以及糖尿病 (diabetes)、肥胖症 (obesity) 或内毒素血症 (endotoxemia) 的血管并发症 (vascular complication)。

[0137] 在具体的实施方案中,本发明提供用于治疗携带提高的响应基因型的患有心血管病症的患者的S-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯,其中心血管病症选自由下列组成的组：心血管疾病 (cardiovascular disease)、冠状动脉心脏病 (coronary heart disease)、冠状动脉疾病 (coronary artery disease)、低 α 脂蛋白血症 (hypoalphalipoproteinemia)、高 β 脂蛋白血症 (hyperbetalipoproteinemia)、高胆固醇血症 (hypercholesterolemia)、高脂血症 (hyperlipidemia)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis)、高血压 (hypertension)、高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia)、高脂蛋白血症 (hyperlipidoproteinemia)、外周血管疾病 (peripheral vascular disease)、心绞痛 (angina)、缺血 (ischemia)、和心肌梗死 (myocardial infarction)。

[0138] 在另一个实施方案中,本发明提供一种预测心血管病症患者是否具有增加的受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的治疗的可能性的方法,所述方法包括筛选从所述患者分离的样品的9型腺苷酸环化酶基因 (ADCY9) 中的遗传标记,所述遗

传标记选自rs12595857/GG、rs1967309/AA、rs111590482/AG、rs111590482/GG、rs11647828/GG、rs12935810/GG、rs17136707/GG、rs2239310/GG、rs2283497/AA、rs2531967/AA、rs3730119/AA、rs4786454/AA、rs74702385/GA、rs74702385/AA、rs8049452/GG、rs8061182/AA,其中患者具有增加的受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂的所述治疗的可能性。在具体的实施方案中,所筛选的遗传标记选自rs12595857/GG;rs1967309/AA。更具体地,所筛选的遗传标记是rs1967309/AA。

[0139] 在另外的实施方案中,本发明提供一种选择可能响应于包括HDL升高剂或HDL模拟剂的治疗的心血管病症患者的方法,所述方法包括:

[0140] (a) 检测来自所述患者的样品中的在rs1967309处的AA基因型,

[0141] (b) 当在来自所述患者的所述样品中检测到具有AA基因型的rs1967309时,选择更有可能响应于包括HDL升高剂或HDL模拟剂的治疗的所述患者。

[0142] 在具体的实施方案中,本发明提供在本文中描述的方法,其中参考样品中在rs1967309处的AA基因型的存在表明所述患者更有可能响应于利用HDL升高剂或HDL模拟剂的所述治疗。

[0143] 在具体的实施方案中,本发明提供在本文中描述的方法,所述方法还包括c) 选择包括HDL升高剂或HDL模拟剂的所述治疗。

[0144] 在具体的实施方案中,本发明提供在本文中描述的方法,其中通过下列方式完成检测rs1967309:检测来自患者的样品中的rs1967309,使样品与结合rs1967309的试剂接触,从而形成试剂和rs1967309之间的复合物,检测形成的复合物,并且从而检测rs1967309。

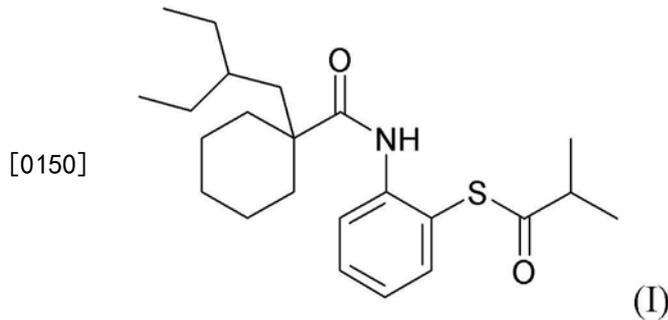
[0145] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于确定人患者中对HDL升高剂或HDL模拟剂的临床响应的预后的方法,其中确定与对所述HDL升高剂或模拟剂的延迟的、部分亚最佳的或缺乏的临床响应有关的患者的所述ADCY9基因中至少一个多态性的存在,其中至少一个,其中至少一个第一多态性rs1967309被确定。

[0146] 在具体的实施方案中,本发明提供在本文中描述的方法,其中多态性通过基因分型分析来确定。

[0147] 在具体的实施方案中,本发明提供在本文中描述的方法,其中基因分型分析包括微阵列分析或质谱分析或者利用多态性特异性引物和/或探针,特别是引物延伸反应。

[0148] 在具体的实施方案中,本发明提供在本文中描述的方法,其中HDL升高剂或HDL模拟剂是HDL升高剂,特别是CETP抑制剂/调节剂,更特别是S-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯。

[0149] 在具体的实施方案中,“CETP抑制剂/调节剂”硫代异丁酸S-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯,其也被称为S-[2-([[1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基]氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯、达塞曲匹或式I的化合物



[0151] 已经显示S-[2-([1-(2-乙基丁基)环己基]羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯是人(de Grooth等人,Circulation,105,2159-2165(2002))和兔子(Shinkai等人,J.Med.Chem.,43,3566-3572(2000);Kobayashi等人,Atherosclerosis,162,131-135(2002);和Okamoto等人,Nature,406(13),203-207(2000))中的CETP活性的抑制剂。已经显示S-[2-([1-(2-乙基丁基)环己基]羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯增加人(de Grooth等人,见上文)和兔子(Shinkai等人,见上文;Kobayashi等人,见上文;Okamoto等人,见上文)中的血浆HDL胆固醇。此外,已经显示S-[2-([1-(2-乙基丁基)环己基]羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯降低人(de Grooth等人,见上文)和兔子(Okamoto等人,见上文)中的LDL胆固醇。在EP1020439、Shinkai等人,J.Med.Chem.43:3566-3572(2000)或WO 2007/051714、WO 2008/074677或WO2011/000793中描述了S-[2-([1-(2-乙基丁基)环己基]羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯以及制造和使用该化合物的方法。

[0152] 在优选实施方案中,CETP抑制剂/调节剂(例如,式I的化合物)是晶体或非晶体形式、或更优选的晶体形式的固体。在具体的实施方案中,S-[2-([1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯是如WO2012/069087中公开的晶体形式A。通过在约7.9°、8.5°、11.7°、12.7°、17.1°、18.0°、18.5°、20.2°、22.1°、24.7°±0.2°具有峰的X射线粉末衍射图,具体通过在7.9°、11.7°、17.1°、18.5°(±0.2°)的衍射角2θ观察到的XRPD峰,表征形式A。

[0153] 在本领域中已知的和在本发明中可用的其他CETP抑制剂包括:依塞曲匹、安塞曲匹和托塞曲匹,特别是依塞曲匹和安塞曲匹。

[0154] 因此,本发明提供用于治疗或预防哺乳动物中的心血管病症的方法,所述方法包括向哺乳动物(优选需要其的哺乳动物)施用治疗有效量的药物组合物。哺乳动物优选是人(即,男人或女人)。人可以是任何种族的(例如,高加索人或东方人)。

[0155] 心血管病症优选地选自由下列组成的组:哺乳动物中的动脉粥样硬化(atherosclerosis),外周血管疾病(peripheral vascular disease),异常脂肪血症(dyslipidemia),高β脂蛋白血症(hyperbetalipoproteinemia),低α脂蛋白血症(hypoalphalipoproteinemia),高胆固醇血症(hypercholesterolemia),高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia),家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia),绞痛(angina),缺血(ischemia),心脏缺血(cardiac ischemia),卒中(stroke),心肌梗死(myocardial infarction),再灌注损伤(reperfusion injury),血管成形再狭窄(angioplastic restenosis),高血压(hypertension),以及糖尿病(diabetes)、肥胖症(obesity)或内毒素血症(endotoxemia)的血管并发症(vascular complication)。更优选地,心血管病症选自由下列组成的组:心血管疾病(cardiovascular disease)、冠状动脉心

脏病 (coronary heart disease)、冠状动脉疾病 (coronary artery disease)、低 α 脂蛋白血症 (hypoalphalipoproteinemia)、高 β 脂蛋白血症 (hyperbetalipoproteinemia)、高胆固醇血症 (hypercholesterolemia)、高脂血症 (hyperlipidemia)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis)、高血压 (hypertension)、高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia)、高脂蛋白血症 (hyperlipidoproteinemia)、外周血管疾病 (peripheral vascular disease)、心绞痛 (angina)、缺血 (ischemia)、和心肌梗死 (myocardial infarction)。

[0156] 在本发明的某些实施方案中,向受试者施用100mg至600mg之间的S-[2-([1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯。具体地,向受试者施用150mg至450mg之间的S-[2-([1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯。更具地,向受试者施用250mg至350mg之间的S-[2-([1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯。最具体地,向受试者施用250mg至350mg之间的S-[2-([1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯。

[0157] 在本发明的另一个实施方案中,向儿科用途的受试者施用25mg至300mg之间的S-[2-([1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯。具体地,向儿科用途的受试者施用75mg至150mg的S-[2-([1-(2-乙基丁基)-环己基]-羰基)氨基)苯基]2-硫代甲基丙酸酯。

[0158] 可以将CETP抑制剂以任何适合的剂量(例如,为了实现治疗有效量)施用于哺乳动物。例如,用于向患者施用的治疗有效量的化合物I的适合剂量将会是在大约100mg至约1800mg/天之间。所需的剂量优选为约300mg至约900mg/天。优选的剂量约为600mg/天。

[0159] 基因分型方法

[0160] 可以通过对于本领域技术人员来说公知的多种方法中的任何一种进行样品中特定基因型的鉴定。例如,可以通过使用在本领域内公知的技术克隆等位基因并且对其测序来完成多态性的鉴定。备选地,可以例如使用PCR由基因组DNA扩增基因序列,并且对产物测序。在本领域中已知许多方法用于分离和分析受试者的DNA的给定的遗传标记,包括聚合酶链式反应(PCR)、连接链式反应(LCR)或连接扩增和扩增方法如自我持续序列复制。下面描述用于分析患者的DNA在给定的遗传基因座处的突变的多种非限制性方法。

[0161] 可以使用DNA微阵列技术,例如DNA芯片装置和用于高通量筛选用途的高密度微阵列和较低密度微阵列。用于微阵列制造的方法是在本领域中已知的并且包括各种喷墨和微喷射沉积或点样 (spotting) 技术和工艺,原位或芯片上光刻法寡核苷酸合成工艺,以及电子DNA探针寻址工艺。已经将DNA微阵列杂交用途成功应用于对点突变、单核苷酸多态性 (SNP)、和短串联重复序列 (STR) 的基因表达分析和基因分型的领域。额外的方法包括干扰RNA微阵列以及微阵列与其他方法如激光捕获显微切割 (LCM)、比较基因组杂交 (CGH) 和染色质免疫沉淀 (Chip) 的组合。参见,例如,He等人 (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593:117-133和Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:129-153。其他方法包括PCR、xMAP、侵入测定 (invader assay)、质谱法、和焦磷酸测序 (Wang等人 (2007) 微阵列技术和癌基因谱 (Microarray Technology and Cancer Gene Profiling), 实验医学与生物学进展 (Advances in Experimental Medicine and Biology) 系列丛书第593卷,纽约Springer出版)。

[0162] 另一种检测方法是使用与多态性位点重叠并且在多态性区周围具有约5、或备选

10、或备选20、或备选25、或备选30个核苷酸的探针的等位基因特异性杂交。例如,将多个能够与目标等位基因变体或遗传标记特异性地杂交的探针连接至固相载体,例如“芯片”。寡核苷酸探针可以通过包括光刻在内的各种工艺与固体载体结合。例如,在Cronin等人(1996) Human Mutation (人类突变) 7':244中描述了使用这些包含寡核苷酸的芯片的突变检测分析,其也被称为“DNA探针阵列”。

[0163] 在其他检测方法中,需要在鉴定等位基因变体前首先扩增基因的至少一部分。例如,可以通过PCR和/或LCR或在本领域内公知的其他方法进行扩增。

[0164] 在一些情况下,可以通过限制性酶分析显示来自受试者的DNA中的特定等位基因的存在。例如,特定的核苷酸多态性可以得到包含在另一个等位基因变体的核苷酸序列中不存在的限制性位点的核苷酸序列。

[0165] 在另外的实施方案中,防范切割剂(如核酸酶、羟胺或四氧化锇以及哌啶)可以用于检测RNA/RNA DNA/DNA、或RNA/DNA异源双链体中错配的碱基(参见,例如,Myers等人(1985) Science 230:1242)。通常,“错配切割”的技术以提供通过将任选标记的、包含基因的等位基因变体的核苷酸序列的探针例如RNA或DNA与样品核酸杂交形成的双链体开始。利用切割双链体(如基于对照和样品链之间的碱基对错配形成的双链体)的单链区的试剂处理双链的双链体。例如,RNA/DNA双链体可以利用RNase处理和DNA/DNA杂合体用SI核酸酶处理以将错配区酶促消化。备选地,可以利用羟胺或四氧化锇以及哌啶处理DNA/DNA或RNA/DNA双链体以便消化错配区。在错配区消化之后,然后在变性聚丙烯酰胺凝胶上将所得到的材料按尺寸分离,以确定对照和样品核酸是否具有相同的核苷酸序列或者它们哪些核苷酸是不同的。参见,例如,美国专利号6,455,249;Cotton等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397;Saleeba等人(1992) Meth. Enzymol. 217:286-295。

[0166] 也可以利用电泳迁移率的改变来鉴定特定的等位基因变体。例如,可以使用单链构象多态性(SSCP)检测突变体和野生型核酸之间的电泳迁移率的差异(Orita等人(1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766;棉花(1993) Mutat. Res. 285:125-144和Hayashi(1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79)。将样品和对照核酸的单链DNA片段变性并且使其复性。单链核酸的二级结构根据序列而变化;所得到的电泳迁移率的改变使得能够检测甚至单碱基变化。可以用标记的探针来标记或检测DNA片段。可以通过使用其中二级结构对序列中的变化更敏感的RA(而不是DNA)来增强测定的灵敏度。在另一个优选的实施方案中,主题方法使用异源双链体分析基于电泳迁移率的变化将双链异源双链体分子分离(Keen等人(1991) Trends Genet. 7:5)。

[0167] 通过分析包含多态性区域的核酸在含有梯度变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中的移动,即使用变性梯度凝胶电泳(DGGE),也可以获得等位基因变体或遗传标记的特性(Myers等人(1985) Nature 313:495)。当使用DGGE作为分析方法时,将会修饰DNA以确保不使其完全变性,例如通过借助PCR加入大约40bp的高熔点的富含GC的DNA的GC钳(GC clamp)。在另外的实施方案中,使用温度梯度代替变性剂梯度以鉴定对照和样品DNA的迁移率的差异(Rosenbaum和Reissner(1987) Biophys. Chem. 265:1275)。

[0168] 用于检测2个核酸之间的至少一个核苷酸的差异的技术的实例包括,但不限于,选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增、或选择性引物延伸。例如,可以制备寡核苷酸探针,其中已知的多态性核苷酸中心放置(等位基因特异性探针)并且之后与目标DNA在只有发现完美配

对才允许杂交的条件下杂交 (Saiki等人 (1986) Nature 324:163); Saiki等人 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230)。这种等位基因特异性寡核苷酸杂交技术用于检测基因的多态性区中的变化。例如, 将具有特定等位基因变体的核苷酸序列的寡核苷酸探针与杂交膜连接并且之后将这个膜与标记的样品核酸杂交。杂交信号的分析之后将会揭示样品核酸的核苷酸的特性。

[0169] 备选地, 取决于选择性PCR扩增的等位基因特异性扩增技术可以与本发明结合使用。用作引物的用于特异性扩增的寡核苷酸可以在分子的中心携带目标等位基因变体 (从而扩增取决于示差杂交) (Gibbs等人 (1989) Nucl. Acids Res. 17:2437-2448) 或者恰好在一个引物的3'末端携带目标等位基因变体, 其中在适合的条件下, 错配可以防止或减少聚合酶延伸 (Prossner (1993) Tibtech 11:238和Newton等人 (1989) Nucl. Acids Res. 17:2503)。这种技术也被称为“PROBE”, 其代表Probe Oligo Base Extension。此外, 可能所需的是在突变区中引入新的限制性位点以产生基于切割的检测 (Gasparini等人 (1992) Mol. Cell. Probes 6:1)。

[0170] 在另一个实施方案中, 使用寡核苷酸连接测定 (OLA) 进行等位基因变体或遗传标记的鉴定, 如例如在美国专利号4,998,617中和在Laridegren, U.等人Science 241:1077-1080 (1988)中描述的。OLA方案使用两个被设计为能够与邻接的目标的单链序列杂交的寡核苷酸探针。连接一个寡核苷酸以分离标记, 例如生物素化的, 并且另一个被可检测地标记。如果在目标分子中发现精确互补序列, 寡核苷酸将会杂交以使它们的末端邻接, 并且形成连接底物。之后连接允许使用抗生物素蛋白、或另一种生物素配体回收标记的寡核苷酸。Nickerson, D.A.等人已经描述了结合PCR和OLA的特性的核酸检测测定 (Nickerson, D.A.等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8923-8927)。在这种方法中, 使用PCR实现目标DNA的指数扩增, 其之后使用OLA检测。如Tobe等人 (1996) Nucleic Acids Res. 24:3728中描述的OLA方法的变化, 用唯一的半抗原, 即地高辛 (digoxigenin) 和荧光素 (fluorescein) 标记每个等位基因特异性引物, 并且使用利用报告酶标记的半抗原特异性抗体检测每个OLA反应。

[0171] 本发明提供用于检测ADCY9中的单核苷酸多态性 (SNP) 的方法。因为单核苷酸多态性的侧面是不变序列区, 对于每个患者来说, 它们的分析只需要确定单个变体核苷酸的特性, 并且不需要确定全部基因序列。已经开发了多种方法以帮助SNP的分析。

[0172] 可以通过使用如例如在美国专利号4,656,127中公开的专门的核酸外切酶抗性核苷酸来检测单碱基多态性。根据该方法, 允许紧接多态性位点的3'的与等位基因序列互补的引物与从特定的动物或人得到的目标分子杂交。如果在目标分子上的多态性位点含有与存在的特定核酸外切酶抗性核苷酸衍生物互补的核苷酸, 则将会使该衍生物结合至杂交的引物的末端。这种结合使得引物对核酸外切酶具有抗性, 并且从而允许其检测。因为样品的核酸外切酶抗性衍生物的特性是已知的, 引物已经变得对核酸外切酶具有抗性的发现揭示了在目标分子的多态性位点中存在的核苷酸与在反应中使用的核苷酸衍生物互补。这种方法具有这样的优点: 其不需要确定大量的外部序列数据。

[0173] 也可以使用溶液系方法确定多态性位点的核苷酸的特性 (WO 91/02087)。如上, 采用与紧接多态性位点的3'的等位基因序列互补的引物。该方法使用如果与多态性位点的核苷酸互补则将会结合至引物末端的标记的双脱氧核苷酸衍生物确定了该位点的核苷酸的特性。

[0174] 在WO 92/15712中描述了备选方法。这种方法使用标记的终止子和与连接多态性位点的3'的序列互补的引物的混合物。因此,通过在被评价的目标分子的多态性位点中存在的核苷酸,并且与其互补,确定了所结合的标记的终止子。该方法通常是非均相测定,其中将引物或目标分子固定至固相。

[0175] 已经描述了用于测定DNA中的多态性位点的许多其他引物导向的核苷酸结合过程(Komher, J.S. 等人(1989) Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784; Sokolov, B.P. (1990) Nucl. Acids Res. 18:3671; Syvanen, A.-C 等人(1990) Genomics 8:684-692; Kuppaswamy, M.N. 等人(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1143-1147; Prezant, T.R. 等人(1992) Hum. Mutat. 1:159-164; Ugozzoli, L. 等人(1992) GATA 9:107-112; Nyren, P. 等人(1993) Anal. Biochem. 208:171-175)。这些方法全部依赖于标记的脱氧核苷酸的结合以区分在多态性位点处的碱基。

[0176] 此外,应理解的是,可以用于以上用于检测基因或基因产物或多态性变体中的改变的方法中的任何一种以监测治疗或疗法的进程。

[0177] 例如,通过使用预包装的诊断试剂盒,如以下所述的那些,其包含可以方便用于基因分型的至少一种探针、引物核酸、或试剂,可以进行在本文中所描述的方法,例如分析 ADCY9 基因中存在的遗传标记以确定个体是否具有增加的受益于利用 HDL 升高剂或模拟剂的治疗的可能性,所述 HDL 升高剂或模拟剂包括 HDL 升高剂或 HDL 模拟剂,特别是 CETP 抑制剂/调节剂。具体地,遗传标记是如在本文中所描述的。

[0178] 本发明的引物或探针,用作用于将 ADCY9 基因中存在的遗传标记基因分型的试剂,包括与 ADCY9 基因内的连续序列互补并杂交的优选 12 至 30 个核苷酸的合成核苷酸序列,其邻接或包围选自下列各项中的一个或多个 SNP: rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119 和 rs13337675, 优选 rs1967309。在其他方面中,引物包含 100 个以下的核苷酸,在某些方面中为 12 至 50 个核苷酸或 12 至 30 个核苷酸。引物具有与该连续序列或与该连续核苷酸序列的互补序列至少 70% 的同一性,优选至少 80% 的同一性,并且更优选至少 90% 的同一性。本发明的引物或探针优选是长度为 15-50 个核苷酸,其包含与选自 SEQ. ID. NO. 1-15 中的序列互补、具体地与 SEQ. ID. No. 1 互补的 15 至 20 个核苷酸的区域。探针或引物与 SEQ. ID. NO. 1-15 之间的互补程度可以为 100%、95%、90%、85%、80% 或 75%。

[0179] 遗传等位基因或遗传标记的“特异性”的寡核苷酸,包括探针和引物,与基因的多态性区结合或者与基因的多态性区相邻结合。对于要用作用于扩增的引物的寡核苷酸来说,如果它们足够接近以制备包含多态性区的多核苷酸,则引物是邻接的。在一个实施方案中,如果它们在约 1-2kb 内结合,例如,比多态性小 1kb,则寡核苷酸是邻接的。特定的寡核苷酸能够与序列杂交,并且在适合的条件将不会与仅单个核苷酸不同的序列结合。

[0180] 无论是否用作探针或引物,本发明的寡核苷酸都可以被可检测地标记。标记可以直接(例如对于荧光标记来说)或者间接检测。间接检测可以包括对于本领域技术人员来说已知的任何检测方法,包括生物素-抗生物素蛋白相互作用、抗体结合等。荧光标记的寡核苷酸还可以含有猝灭分子。寡核苷酸可以与表面结合。在一些实施方案中,表面是二氧化硅或玻璃。在一些实施方案中,表面是金属电极。

[0181] 探针可以用于直接确定样品的基因型或者可以与扩增同时使用或在其之后使用。术语“探针”包括自然存在的或重组单链或双链核酸或者化学合成的核酸。它们可以通过切口平移(nick translation)、Klenow填充反应、PCR或在本领域中已知的其他方法标记。在Sambrook等人(1989)见上文中,描述了本发明的探针、其制备和/或标记。探针可以是适用于与含有本发明的多态性区的核酸选择性杂交的任何长度的多核苷酸。所使用的探针的长度将会部分地取决于所使用的测定的性质和所采用的杂交条件。

[0182] 标记的探针还可以与多态性的扩增一起使用。(Holland等人(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7276-7280)。美国专利号5,210,015描述了基于荧光的途径以提供在PCR期间的扩增产物的实时测量。这种途径已经采用了嵌入染料(如溴化乙锭)以指示存在的双链DNA的量,或者它们已经采用了荧光-猝灭剂对的探针(也被称为“TaqMan®”途径),其中在扩增期间将探针切割以释放其浓度与存在的双链DNA的量成比例的荧光分子。在扩增期间,当与目标序列杂交时,通过聚合酶的核酸酶活性消化探针,以使得荧光分子与猝灭剂分子分离,从而使得来自报告分子的荧光出现。TaqMan®途径使用含有与含有多态性的目标多核苷酸的区域特异性退火的报告分子-猝灭剂分子对的探针。

[0183] 探针可以附着至用作“基因芯片”的表面。这种基因芯片可以用于通过对于本领域技术人员来说已知的多种技术检测遗传变异。在一种技术中,将寡核苷酸布置在用于通过借助杂交途径的测序来确定DNA序列的基因芯片,如在美国专利号6,025,136和6,018,041中概述的。本发明的探针还可以用于遗传序列的荧光检测。这种技术已经描述于,例如美国专利号。本发明的探针还可以用于遗传序列的荧光检测。这种技术已经描述于,例如美国专利号5,968,740和5,858,659。探针还可以附着至用于核酸序列的电化学检测的电极表面,如在美国专利号5,952,172中和由Kelley,S.O.等人(1999) Nucl.Acids Res.27:4830-4837描述的。一种或多种用于检测本发明的SNP的探针(表2、3、4或5,尤其是表2)可以附着至芯片,并且这种设备用于预测对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的响应并且为患有心血管疾病的个体选择有效的治疗。可想到的是,可以在芯片上包括用于检测本发明的SNP的探针以及用于除预测对HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的响应之外的用途的各种其他探针。

[0184] 此外,可以将用作探针或引物的合成寡核苷酸修饰以变得更稳定。示例性的修饰的核酸分子包括不带电荷的键,如DNA的氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和甲基磷酸酯类似物(还参见美国专利号5,176,996;5,264,564和5,256,775)。本发明的引物和探针可以包括例如,标记性的甲基化、核苷酸间修饰如侧基部分(例如,多肽)、嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素(psoralen))、螯合剂、烷基化剂和修饰的键(例如, α 端基异构核酸)。还包括的是模仿核苷酸分子与指定序列通过氢键键合和其他化学相互作用结合的能力的合成分子,包括代替核苷酸骨架中的磷酸酯键的肽键。

[0185] 本发明涉及在高严格性杂交条件下与在本文中所描述的自然存在的寡核苷酸、ADCY9基因的基因标记杂交的合成的寡核苷酸分子、引物和探针。可以通过在高严格性条件下的特异性杂交来检测和/或分离寡核苷酸。“高严格性条件”是在本领域中已知的并且允许第一寡核苷酸与第二寡核苷酸在第一和第二寡核苷酸之间存在高互补程度的情况下特

异性杂交。对于在本文中所公开的基因分型方法来说,这种互补程度在80%至100%之间并且优选在90%至100%之间。

[0186] 还可以根据事先存在的数据,如数据库中存在的全基因组序列数据检测本发明的SNP。本发明提供查询基因组数据以确定基因型的计算机执行的方法,以用于预测患者对CETP抑制剂的响应以及因此治疗所述患者,即利用CETP抑制剂治疗响应者患者。

[0187] 用于在基因分型方法、治疗选择或治疗方法中使用的本发明的样品核酸可以从受试者的任何细胞类型或组织中得到。例如,可以通过已知技术得到受试者的体液、样品、(例如,血液)。备选地,可以对干燥样品(例如,毛发或皮肤)进行核酸测试。更具体地,基因分型方法、治疗选择或治疗方法将会使用血液细胞类型。

[0188] 在本文中所描述的本发明涉及这样的方法和试剂:其用于确定和鉴定ADCY9基因上在rs1967309或rs12595857处存在的等位基因,或者与那两个SNP处于连锁不平衡的任何其他遗传变体,如在图8中显示的,其横跨位置chr16:4049365到chr16:4077178(组件GRCh37/hg19。具体地,本发明还涉及用于确定和鉴定在ADCY9基因中下列各项处存在的等位基因:rs1967309、rs12595857、rs2239310、rs11647828、rs8049452、rs12935810、rs74702385、rs17136707、rs8061182、rs111590482、rs4786454、rs2283497、rs2531967、rs3730119、rs13337675,更具体地在rs1967309或rs12595857,并且最具体地在rs1967309处。

[0189] 如在本文中列出的,本发明还提供治疗选择方法,其包括检测ADCY9基因中存在的一种或多种遗传标记。在一些实施方案中,该方法使用包含与ADCY9的多态性区互补的核苷酸序列的探针或引物。因此,本发明提供包含用于进行本发明的基因分型方法的探针和引物的试剂盒。

[0190] 在一些实施方案中,本发明提供一种试剂盒,其用于确定患有心血管病症的患者是否具有增加的受益于利用HDL升高剂或HDL模拟剂、特别是CETP抑制剂/调节剂的治疗的可能性。这种试剂盒含有一种或多种在本文中所描述的试剂,特别是引物或探针,以及使用说明书。仅作为实例,本发明还提供用于确定患有心血管病症的患者是否具有增加的受益于利用硫代异丁酸S-(2-[[1-(2-乙基-丁基)-环己烷羰基]-氨基]-苯基)酯的治疗的可能性的试剂盒,其包含对ADCY9rs1967309SNP中AA多态性特异性的第一寡核苷酸和第二寡核苷酸。

[0191] 试剂盒可以包含至少一种能够与ADCY9的多态性区特异性杂交的探针或引物以及使用说明书。试剂盒通常包含上述核酸中的至少一种。用于扩增ADCY9的至少一部分的试剂盒通常包含两种引物,其中至少一种能够与等位基因变体序列杂交。这种试剂盒适用于通过例如荧光检测、通过电化学检测、或通过其他检测来检测基因型。

[0192] 然而,本发明的其他试剂盒包含至少一种进行测定所需的试剂。例如,试剂盒可以包含酶。备选地,试剂盒可以包含缓冲液或任何其他必需的试剂。

[0193] 试剂盒可以包含在本文中所描述的用于确定受试者的ADCY9的多态性区中的基因型的阳性对照、阴性对照、试剂、引物、测序标记、探针和抗体中的全部或一些。

[0194] 以下实例仅意在说明本发明的实施而不是以限制的方式提供。

[0195] 本发明涉及以下核苷酸和氨基酸序列:

[0196] 在本文中提供的序列可在NCBI数据库中获得并且可以从www.ncbi.nlm.nih.gov/

[sites/entrez?db=gene](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene)检索;这些序列还涉及注释的和修饰的序列。本发明还提供了其中使用同源序列和在本文中提供的简明序列的变体的技术和方法。优选地,这种“变体”是遗传变体。在NCBI数据库上,可获得编码人(homo sapiens)9型腺苷酸环化酶(ACDY9)的核苷酸序列。

[0197] 人9型腺苷酸环化酶(ACDY9),16号染色体上的RefSeqGene

[0198] NCBI参照序列:NCBI编号NG_011434.1

[0199] 人16号染色体基因组重叠群(genomic contig),GRCh37.p10主要组装

[0200] NCBI参照序列:NCBI编号NT_010393.16

[0201] 人ACDY9基因SNP的内含子序列提供“rs”符号,等位基因和相应的SEQ ID数字符号在表2中公开。以粗体和下划线文字鉴定多态性。

[0202] 表4:ACDY9SNP和相应的内含子序列

SNP rs ID	SEQ. ID. NO. :	内含子序列 ¹	HGVS 名称
[0203] rs1967309	20	TTAACCTATTTATTT CTTTCAACCCCT[C/T] AGCCCAGATCCTAA CCTTCGGTAAG (定 位到基因组 Build 37.3)	NC_000016.9:g.4065583A>G NG_011434.1:g.105604T>C NM_001116.3:c.1694-8024T>C NT_010393.16:g.4005583A>G
[0204] rs12595857	2	CATTGATTTTAAAC CTCAACAACAGC[A/ G]ATGTCCTTTATCA GCTTAATTTTAC (定位到基因组 Build 37.3)	NC_000016.9:g.4062592G>A NG_011434.1:g.108595C>T NM_001116.3:c.1694-5033C>T NT_010393.16:g.4002592G>A

[0205] 1. 来自NCBI基因组参照物Build 37.3的来源

[0206] 表5:chr16在基因ACDY9中的遗传变体的列表,其已经根据关于来自用于实验的基因分型芯片(Illumina OMNI2.5S)的参照序列的GWAS研究提供了与对利用达塞曲匹的治疗的响应的关联($P < 0.05$)的证据:

[0207]

Chr.	位置 (GRCh37 /hg19)	SNPrs 标识符 (NCBI)	P 值	序列 ^{1,2}	SEQ. ID NO.
16	4,065,583	rs1967309	4.11E-08	TTCATGCACCCA GCAGACTAAATG TTTACTGAGTAC TTACCGAAGGTT AGGATCTGGGCT [A/G]AGGGTTGA AAGAAATAAATA GGTTAAAAAAGA AAAAAAGCCACC TAGGTGACTTTC ACTC ¹	1
16	4,062,592	rs12595857	4.53E-07	TTAATATGATTT CTTATATTCTTTC CTGGTTATCCAT TGATTTTAAACC TCAACAACAGC[A/G]ATGTCTTTT	2

[0208]

				ATCAGCTTAATT TTACAAAGGCTA CAGAGAGGGGT GGGCATTTCCCTA ATGG ²	
16	4,060,661	rs2239310	1.29E-06	CCTGTGTGGAGC CCATTACCTGAA GAGGGGCCAAG AGGACAAGCAG GTATGACTATGG TC[A/G]GGCGTG CCAAGTCCCAGG ACAAGGAAGGA CGGGTGCTCCAG GAAGCACAGGA GGGGGCAT ²	3
16	4,051,513	rs11647828	2.76E-06	TACCGGATGGCA GTGAGCAGGGA GGCTCACCTGGA TCATTTGGTGAA GGTGGCATCTGC C[T/C]GGTTIGTC CACTGTGAAGTT CCTATTCCTACC CCGCCCCCACC TTTCTTTTTTGAG ATG ²	4
16	4,076,094	rs8049452	6.63E-06	ACTTAACTATTT GTTGGGTGAATA TAGAAATGAATG AATGAATGGATG GATGAGCAGATA [T/C]ATCAAGAA	5

[0209]

				GTTAATTCACAA ATTAAAGCCCAT TATGAAACTAAA GTAGAGGCTGGG CGCG ¹	
16	4,049,365	rs12935810	2.98E-05	ACCCGTGAACAA GTCGGGCCCCCA TCCACGCAATAT CTGCAGTCTCGA CTGTATGATCTC[A/G]TCCTTTGCA GCCACACTGTGA GGCAGCAATGAT CATTCCGCAGAC GGCCACAGACTC CAG ²	6
16	4,065,495	rs74702385	8.87E-05	GACGACACCCAG CACACCCAGCAC ACCCAGCACACC AGCGAACAGCCC ACCAGGTGCTAT [T/C]GCTGTCATT CATTTGCTCATT CGCTCGTTCATG CACCCAGCAGAC TAAATGTTTACT GAG ¹	7
16	4,076,047	rs17136707	9.11E-05	AAAACAGTGCTC CAAAGGCAAAG AAATAGCAAAG ACAGAAGTAAG GCACTTAACTAT TTG[T/C]TGGGTG	8

[0210]

				AATATAGAAATG AATGAATGAATG GATGGATGAGCA GATACATCAAGA AGTTAA ¹	
16	4,070,333	rs8061182	1.51E-04	GGCAGCTATGTA GGAAGCAGTGA AGATCCACATCC TTCCTTATTGGT GAAAGGAATGA AT[T/C]GGAAAC AGAAAGTTCTTT TTTACCTTTATTA AATAAACGTGAA GTCATAAGAACT ACTAA ²	9
16	4,064,368	rs11159048 2	1.64E-04	AGACTTTGTCTC AAAAAAGAAAA AAAAAAAAAAAA GAAGTCCCAAAT AATAAAATATGA GA[T/C]GGATTT ATGGAAGAAAGT GAAAGAAACAA AGGGTAGGCACC TTGCCTGTTTAA TTTGATC ¹	10
16	4,076,136	rs4786454	1.98E-04	TGGATGGATGAG CAGATACATCAA GAAGTTAATTCA CAAATTAAAGCC CATTATGAAACT[A/G]AAGTAGAG	11

[0211]

				GCTGGGCGCGGT GGATCACGCCTA TAATCCCAGCAC TTTGGGAGGTCA AGGC ²	
16	4,066,061	rs2283497	8.87E-04	TGTGATATGATG GTCATATCATAG CACAGGGCTGTT GTGAGGATTA TGAGTTGATTCA[T/G]GTAAACAGG GACATCCGAAAA AGGGAAAGACG GTGCTTGTCTG AGAACAGCTGTG AATG ¹	12
16	4,052,486	rs2531967	1.11E-03	AGGTGAGTGGCC TTAAAGGGGAAG GAGAAACCTTTT GAAAGCAGGAC AGGTCCTCTCTG A[A/G]TCATCCCC GTATGGGTAAAT CTACATCACTAG CTTCATTACTGA CTGGTCCATGTA GAAA ¹	13
16	4,057,603	rs3730119	0.0108	CAGGTATGTCTT CAAACCTATGAT GGATAAAAGTTA CAGTCAGCACAG ATTGAAAGCACC [A/G]TCTGTTGAA	14

[0212]

				ACGCAGCTCCGT CTTGCTCTCTGG AGAGGACTCACT CCTGGAAAGTTG AGA ²	
16	4,077,178	rs13337675	0.0377	TGTAACCAAGTA ACCAATGGTAAA CCTCTACAGGGT ATTAAGGCTCCA GAAAATTCTCTA[A/G]TCAGCCACT TGCTCCTGCTCG AGCCTGCTCCCA CTCCGTGGAGTG TACTTTCATTCA GT ¹	15

[0213] Chr:染色体编号;P值:针对与利用CETP抑制剂达塞曲匹治疗的患者中的心血管事件(主要复合事件或未预见的冠状动脉再血管化)的关联;1:来自1000个基因组的公共数据库的参照序列,如在针对OMNI 2.5S芯片的ILLUMINA注释文件HumanOmni25Exome-8v1_A.csv中给出的;2:来自NCBI的dbSNP公共数据库版本131的参照序列,如在针对OMNI 2.5S芯片的ILLUMINA注释文件HumanOmni25Exome-8v1_A.csv中给出的。

[0214] 表6:chr16上的基因ADCY9中的额外的遗传变体的列表:

变化	位置 ¹	与a的距离 (bp)	r ² ¹	D' ¹	栏 ²	HGV名称 ²	SEQ .ID NO.
rs12920508	16:4066891	1308	0.952954	1	TTTGGGGTGGACG AAAATGTAAAAT TA[C/G/T]GTTGT GGTGA1GGTTC ACAACACC	NC_000016.9:g.4066891 G>C NC_000016.9:g.4066891 G>T NG_011434.1:g.104296 C>A NG_011434.1:g.104296 C>G NM_001116.3:c.1694- 9332C>A NM_001116.3:c.1694- 9332C>G NT_010393.16:g.400689 1G>C NT_010393.16:g.400689 1G>T	16
rs12599911	16:4062436	3147	0.908417	1	GAA1AACCACAC ACATGGACCCTG GG[G/T]TCCAAAG TTCATTAGAA1G GCTCTT	NC_000016.9:g.4062436 G>T NG_011434.1:g.108751 C>A NM_001116.3:c.1694- 4877C>A NT_010393.16:g.400243 6G>T	17
rs2531971	16:4051261	14322	0.840627	0.973493	AAGACAGAGGA ACCCCATAGGC TGG[G/T]GGTGA GCAGGGGGCATG AGGGCTAA	NC_000016.9:g.4051261 C>A NG_011434.1:g.119926 G>T NM_001116.3:c.1884+6 108G>T NT_010393.16:g.399126 1C>A	18
rs2238448	16:4059439	6144	0.840582	0.973467	TG1CCAATA1T TCTT1CTT1CTT T[C/T]1GAGA1GG GGGTCTCACTGT GTTGG	NC_000016.9:g.4059439 T>C NG_011434.1:g.111748 A>G NM_001116.3:c.1694- 1880A>G NT_010393.16:g.399943 9T>C	19

[0216] 索引:

[0217] a.rs1967309

[0218] 1. 来自1000个基因组的公共数据库的位置、r²和D'值

[0219] 2. 来自NCBI的dbSNP公共数据库版本137的参照序列和HGV名称

[0220] 实施例1

[0221] Da1-OUTCOMES试验 (NC20971) 是双盲的、随机化的、安慰剂对照的、平行组、多中心的、III期研究,以评估CETP抑制剂达塞曲匹在最近因急性冠状动脉综合征 (ACS) 而住院的患者中的安全性和功效。在临时分析时,研究包括15871名随机化的患者,其被分配在两个治疗组:安慰剂 (7933名患者) 和达塞曲匹 (600mg每天;7938名患者)。研究已经显示,与安慰剂组相比,在达塞曲匹组中,在主要功效终点中没有事件率降低的证据。da1-OUTCOMES研究详情可以在G.Schwartz等人,N.Engl.J.Med.367;22,2012中找到。基因分型:

[0222] 在Beaulieu-Saucier药物基因组学中心,在GLP环境中进行全基因组分析。根据制造商说明书使用并且处理包含2,567,845个基因组标记的Infinium HumanOmni25Exome-8v1_A BeadChip (Illumina, San Diego, CA)。将大约200ng的基因组DNA全基因组扩增,片段化,并且与结合至每个BeadChip表面的基因座特异性的探针杂交。使用荧光标记的单碱基延伸测定将DNA基因分型。使用Illumina iScan读取器扫描和分析BeadChip。监测Infinium

过程控制并且全部结果在制造商的说明书中。使用Illumina的GenomeStudio版本2011.1, 利用GenTrain 2.0聚类算法(cluster algorithm), 使用0.15的No-Call阈值, 在不存在手动集群调节的情况下, 并且使用制造商的Illumina HumanOmni25Exome-8v1_A集群文件分析扫描的图像。在数据成为可用时, 以三个大小相当的部分生成基因型数据文件。将由GenomeStudio生成的PLINK格式的三个基因分型文件合并, 并且转换为二进制PLINK格式。

[0223] 将样品和SNP的基因分型完成率设定为98%。将具有基因分型板偏向 (plate bias) (基于用于稀释DNA样品的96孔板) 的SNP加标记, 但是不移除, 因为不能排除遗传血统的影响。使用成对的IBD进行亲密家族关系检查。基于不相关的SNP ($r^2 < 0.1$) 的选择, 除了相关对和样品副本的一对成员 (IBS2*比率 > 0.80), 我们将所有加标记并移除。使用成对的IBS矩阵作为公制距离, 以通过多维尺度 (MDS) 鉴定样品与样品异常值之间的相关性。对每个受试者的前两个MDS成分作图, 包括HapMap CEU、JPT-CHB、和YRI数据的基因型 (仅保留祖先个体)。通过k最近邻将来自主要的高加索人种群体的异常值加标记并移除。(补充的图1) 使用EIGENSOFT套件的smartpca程序 (版本3.0) 计算陡坡图和累积解释方差。所使用的选项是0 (关闭) 的numoutlieriter (异常值移除迭代 (outlier removal iteration) 的最大数量) 和等于N0.4的altnormstyle (标准化式) (补充图2)。

[0224] 统计方法

[0225] 在Beaulieu-Saucier药物基因组学中心开发统计学分析计划并且在2012年10月基因分型完成前最终版本批准。对遗传数据进行的统计学试验是双向的, 并且进行调节以解释SNP的多个测试。使用 $p < 5 \cdot 10^{-8}$ 的全基因显著性阈值作为显著发现的可接受阈值。认为具有 $p < 1 \cdot 10^{-6}$ 的结果是潜在的候选物。多变量模型包括包括性别作为协变量以及人群结构的前5个主要成分 (PC) 以避免被人群结构混淆。将分析集合定义为达塞曲匹治疗组的参与者, 并且在安慰剂组中验证, 以确认效果的缺乏和通过在组合的集合中的治疗组相互作用来测试基因。

[0226] 使用PLINK软件版本1.07进行具有高频遗传变体 ($MAF \geq 0.05$) 的全基因组关联试验。在SAS软件中验证具有 P 值 $\leq 10^{-6}$ 的全部结果。使用1自由度的加性遗传试验 (additive genetic test)。根据次要等位基因的计数, 将基因型编码作为0、1或2。在存在协变量的情况下, 针对协变量调整加性遗传试验的 P 值, 从而在加性试验下

$\log\left(\frac{r}{1-r}\right) = b_0 + b_1 add + \sum_j b_j cov_j$ 或 $\log(\text{事件率}) = b_0 + b_1 add + \sum_j b_j cov_j$ 以及零 (H_0) 具有 $b_1 = 0$ 。首先使用逻辑回归模型, 使用PLINK软件, 对事件出现相对于不出现进行全基因组分析。在SAS软件v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 中验证来自给出 P 值 $\leq 10^{-6}$ 的逻辑回归试验的全部结果, 并且使用Cox比例风险回归进行验证。预先确定了来自Cox回归的结果比逻辑回归的那些更适用于研究目标并且计划作为主要结果报告。根据: $\log(\text{事件率}) \sim$ 基因型+治疗组+基因型*治疗组+性别+PC, 利用治疗和安慰剂组样品二者, 还使用Cox比例风险回归模型测试通过治疗相互作用的基因 (gene-by-treatment interaction)。

[0227] 9型腺苷酸环化酶基因ADCY9中的内含子变体rs1967309与事件显著相关 (Cox比例风险 $p = 2.4 \cdot 10^{-8}$)。在这个位置的遗传变体具有0.45的较小等位基因频率, 并且对于dal-0utcomes治疗组中的事件, 一个等位基因的加性遗传作用具有 $HR = 0.65$ (95%CI 0.55, 0.76)。基因与治疗组相互作用 p 值是0.0013, 并且在单独的安慰剂组中没有可检测的变体的遗传作 ($p = 0.25$)。利用抑制素的调节的灵敏度分析是一致的 ($p = 5.4 \cdot 10^{-8}$)。处于连锁

不平衡 ($r^2=0.86$) 中的相邻SNP、rs12595857具有相关的结果。根据基因型分层显示出,与参比的GG纯合体相比,对于dal-Outcomes治疗组中的事件,在rs1967309处的纯合体AA具有HR=0.40 (95%CI 0.28,0.57),并且杂合体AG具有HR=0.68 (95%CI 0.55,0.84)。在rs1967309处的纯合体AA的亚组中,利用达塞曲匹的治疗相对于安慰剂具有a HR=0.61 (95%CI 0.41,0.92)。

[0228] 表7:针对鉴定为与ADCY9基因中的事件相关的SNP,仅达塞曲匹治疗组中的患者的事件时间(第一次出现CHD死亡、MI、因ACS而住院、心脏停搏复苏(resuscitated cardiac arrest)、动脉粥样硬化血栓形成性卒中(atherothrombotic stroke)或未预见的冠状动脉再血管化)的风险比率(HR),比较了对于变体等位基因来说杂合和纯合的患者与对于常见等位基因来说纯合的患者。

[0229]

SNP rs标识符	N名患者	基因型比较	HR (95%CI)*
rs12935810	2844	GA vs GG	1.3 (1.02, 1.65)
rs12935810	2844	AA vs GG	1.87 (1.42, 2.48)
rs11647828	2822	AG vs AA	0.74 (0.6, 0.92)
rs11647828	2822	GG vs AA	0.46 (0.33, 0.63)
rs2531967	2834	GA vs GG	0.75 (0.61, 0.93)
rs2531967	2834	AA vs GG	0.5 (0.29, 0.86)
rs3730119	2845	GA vs GG	0.78 (0.62, 0.99)
rs3730119	2845	AA vs GG	0.49 (0.22, 1.1)
rs2239310	2841	AG vs AA	0.71 (0.58, 0.87)
rs2239310	2841	GG vs AA	0.43 (0.29, 0.63)

[0230]

rs12595857	2838	AG vs AA	0.7 (0.57, 0.87)
rs12595857	2838	GG vs AA	0.45 (0.33, 0.62)
rs111590482	2783	AG vs AA	0.64 (0.49, 0.84)
rs111590482	2783	GG vs AA	0.15 (0.02, 1.1)
rs74702385	2845	GA vs GG	0.63 (0.48, 0.83)
rs74702385	2845	AA vs GG	0.14 (0.02, 1)
rs1967309	2842	GA vs GG	0.68 (0.56, 0.84)
rs 1967309	2842	AA vs GG	0.4 (0.28, 0.57)
rs2283497	2845	CA vs CC	0.83 (0.67, 1.02)
rs2283497	2845	AA vs CC	0.53 (0.37, 0.76)
rs8061182	2843	AG vs AA	1.23 (0.98, 1.56)
rs8061182	2843	GG vs AA	1.81 (1.37, 2.39)
rs17136707	2841	AG vs AA	0.62 (0.47, 0.81)
rs17136707	2841	GG vs AA	0.16 (0.02, 1.15)
rs8049452	2845	GA vs GG	1.26 (0.99, 1.6)
rs8049452	2845	AA vs GG	1.98 (1.51, 2.61)

rs4786454	2845	GA vs GG	0.69 (0.54, 0.87)
rs4786454	2845	AA vs GG	0.37 (0.15, 0.9)
rs13337675	2843	AG vs AA	0.84 (0.68, 1.03)
rs13337675	2843	GG vs AA	0.7 (0.43, 1.14)

[0231] *在不调节协变量的情况下的对每个SNP根据基因型分层的利用常见等位基因纯合基因型作为参照组的Cox比例风险回归。

[0232] 表8:按照鉴定为与ADCY9基因中的事件相关的SNP的基因型分层的、关于达塞曲匹治疗组相对于安慰剂组的事件时间(第一次出现CHD死亡、MI、因ACS而住院、心脏停搏复苏、动脉粥样硬化血栓形成性卒中或未预见的冠状动脉再血管化)的风险比率(HR):

[0233]

SNP rs 标识符	基因型	N 名患者	N 名有 事件的 患者	N 名无 事件的 患者	HR(95% CI)*	预测的 响应
rs12935810	GG	1848	225	1623	0.79 (0.61, 1.03)	R
rs12935810	GA	2861	385	2476	1.03 (0.84, 1.26)	NR
rs12935810	AA	1038	177	861	1.28 (0.95, 1.73)	NR
rs11647828	AA	1789	276	1513	1.33 (1.05, 1.68)	NR
rs11647828	AG	2830	385	2445	0.97 (0.8, 1.19)	PR
rs11647828	GG	1087	121	966	0.61 (0.42, 0.87)	R
rs2531967	GG	3396	497	2899	1.12 (0.94, 1.33)	NR
rs2531967	GA	2010	258	1752	0.86 (0.67, 1.1)	PR
rs2531967	AA	324	32	292	0.67 (0.33, 1.34)	R
rs3730119	GG	3934	559	3375	1.08 (0.92, 1.28)	NR
rs3730119	GA	1655	211	1444	0.86 (0.66, 1.13)	PR
rs3730119	AA	160	18	142	0.48 (0.18, 1.27)	R
rs2239310	AA	2322	370	1952	1.16 (0.95, 1.42)	NR
rs2239310	AG	2690	343	2347	0.96 (0.78, 1.19)	PR
rs2239310	GG	733	75	658	0.6 (0.37, 0.95)	R

[0234]

rs12595857	AA	1741	282	1459	1.27 (1.01, 1.61)	NR
rs12595857	AG	2867	385	2482	0.95 (0.78, 1.16)	PR
rs12595857	GG	1131	119	1012	0.7 (0.48, 1)	R
rs111590482	AA	4301	632	3669	1.04 (0.89, 1.22)	NR
rs111590482	AG	1252	135	1117	0.85 (0.6, 1.19)	R
rs111590482	GG	81	5	76	0.26 (0.03, 2.3)	R
rs74702385	GG	4393	646	3747	1.05 (0.9, 1.23)	NR
rs74702385	GA	1266	137	1129	0.84 (0.6, 1.18)	R
rs74702385	AA	89	5	84	0.26 (0.03, 2.36)	R
rs1967309	GG	1984	322	1662	1.27 (1.02, 1.58)	NR
rs1967309	GA	2796	368	2428	0.94 (0.77, 1.16)	PR
rs1967309	AA	961	97	864	0.61 (0.41, 0.92)	R
rs2283497	CC	2098	304	1794	1.23 (0.98, 1.54)	NR
rs2283497	CA	2765	377	2388	0.99 (0.81, 1.21)	PR
rs2283497	AA	885	107	778	0.57 (0.38, 0.85)	R
rs8061182	AA	2018	257	1761	0.79 (0.62, 1.01)	R
rs8061182	AG	2800	381	2419	0.99 (0.81, 1.21)	PR
rs8061182	GG	923	148	775	1.55 (1.11, 2.15)	NR
rs17136707	AA	4423	649	3774	1.06 (0.91, 1.24)	NR
rs17136707	AG	1241	135	1106	0.8 (0.57, 1.13)	PR
rs17136707	GG	80	4	76	0.37 (0.04, 3.54)	R

[0235]

rs8049452	GG	1930	239	1691	0.78 (0.6, 1)	R
rs8049452	GA	2832	384	2448	0.97 (0.8, 1.19)	PR
rs8049452	AA	983	165	818	1.55 (1.14, 2.12)	NR
rs4786454	GG	3973	588	3385	1.06 (0.9, 1.25)	NR
rs4786454	GA	1615	186	1429	0.89 (0.67, 1.19)	PR
rs4786454	AA	161	14	147	0.52 (0.17, 1.54)	R
rs13337675	AA	3250	467	2783	1.07 (0.89, 1.28)	NR
rs13337675	AG	2145	284	1861	0.89 (0.71, 1.13)	PR
rs13337675	GG	345	36	309	1.03 (0.53, 1.97)	PR

[0236] *按照基因型组分层的在没有协变量调节的情况下的治疗效果的Cox比例风险回归。

序列表

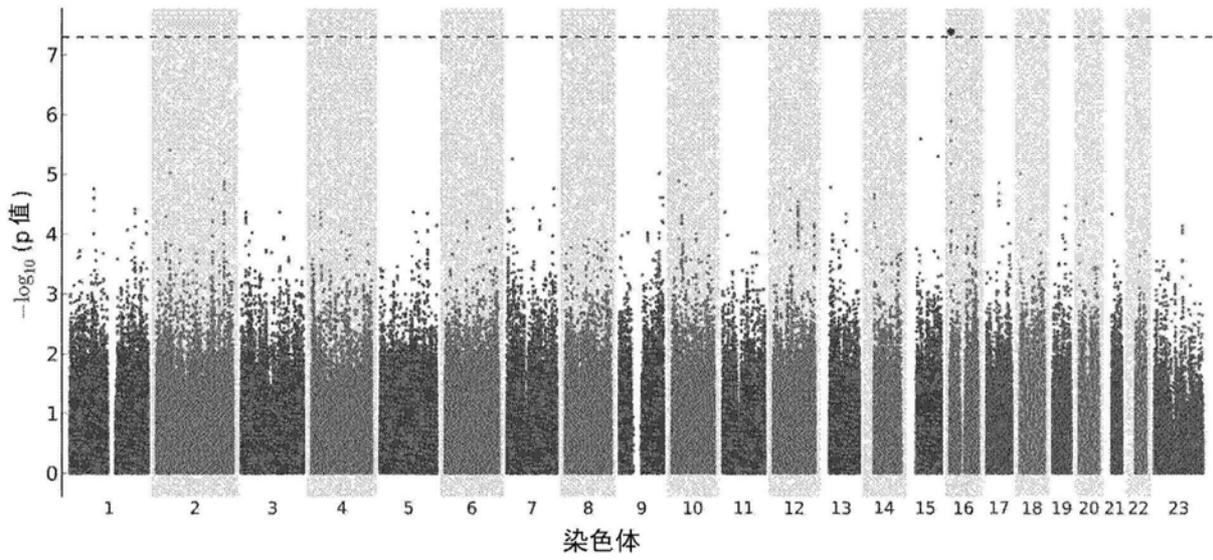
	<110> 豪夫迈·罗氏有限公司	
	<120> 用于预测对于治疗的响应性的遗传标记	
	<130> 31530 EP	
	<160> 20	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> y=A/G	
	<400> 1	
	ttcatgcacc cagcagacta aatgtttact gagtacttac cgaaggtag gatctgggct	60
	yagggttgaa agaaataaat aggttaaaaa agaaaaaaag ccacctaggt gactttcact	120
	c	121
	<210> 2	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0001]	<220>	
	<221> y	
	<222> (27).. (27)	
	<223> Y=A/G	
	<400> 2	
	cattgatttt aaacctcaac aacagcyatg tcttttatca gcttaatttt ac	52
	<210> 3	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> y=A/G	
	<400> 3	
	cctgtgtgga gccattacc tgaagagggg ccaagaggac aagcaggtat gactatggtc	60
	yggcgtgcca agtcccagga caaggaagga cgggtgctcc aggaagcaca ggagggggca	120
	t	121
	<210> 4	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> Y=T/C	

	<400> 4		
	taccggatgg cagtgagcag ggaggetcac ctggatcatt tggatgaaggt ggcactctgcc	60	
	yggtttgtcc actgtgaagt tctattcct accccgcccc ccacctttct tttttgagat	120	
	g	121	
	<210> 5		
	<211> 121		
	<212> DNA		
	<213> 智人 (Homo sapiens)		
	<220>		
	<221> y		
	<222> (61).. (61)		
	<223> y=T/C		
	<400> 5		
	acttaactat ttgttgggtg aatatagaaa tgaatgaatg aatggatgga tgagcagata	60	
	yatcaagaag ttaattcaca aattaaagcc cattatgaaa ctaaagtaga ggctgggcgc	120	
	g	121	
	<210> 6		
	<211> 121		
	<212> DNA		
	<213> 智人 (Homo sapiens)		
	<220>		
	<221> y		
	<222> (61).. (61)		
	<223> y=A/G		
[0002]	<400> 6		
	accctgaac aagtcgggcc cccatccaag caatatctgc agtctcgact gtatgatctc	60	
	ytctttgca gccacactgt gaggcagcaa tgatcattcc gcagacggcc acagactcca	120	
	g	121	
	<210> 7		
	<211> 121		
	<212> DNA		
	<213> 智人 (Homo sapiens)		
	<220>		
	<221> y		
	<222> (61).. (61)		
	<223> Y=T/C		
	<400> 7		
	gacgacccc agcacacca gcacaccag cacaccagcg aacagcccac caggtgctat	60	
	ygctgtcatt catttgctca ttctctggtt catgcacca gcagactaaa tgtttactga	120	
	g	121	
	<210> 8		
	<211> 121		
	<212> DNA		
	<213> 智人 (Homo sapiens)		
	<220>		
	<221> Y		
	<222> (61).. (61)		

	<223> Y=T/C	
	<400> 8	
	aaaacagtgc tccaaaggca aagaaatagc aaagacagaa gtaaggcact taactatttg	60
	ytgggtgaat atagaaatga atgaatgaat ggatggatga gcagatacat caagaagtta	120
	a	121
	<210> 9	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> Y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> Y=T/C	
	<400> 9	
	ggcagctatg taggaagcag tgaagatcca catccttctct tattggtgaa aggaatgaat	60
	yggaaacaga aagttctttt ttacctttat taaataaacg tgaagtcata agaactacta	120
	a	121
	<210> 10	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
[0003]	<222> (61).. (61)	
	<223> Y=T/C	
	<400> 10	
	agactttgtc tcaaaaaaga aaaaaaaaaa aaaagaagtc ccaataata aatatgaga	60
	yggatttatg gaagaaagtg aaagaaacaa aggtaggca ccttgccctgt ttaatttgat	120
	c	121
	<210> 11	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> y=A/G	
	<400> 11	
	tggatggatg agcagataca tcaagaagtt aattcacaaa ttaaagecca ttatgaaact	60
	yaagtagagg ctgggcgcgg tggatcacgc ctataatccc agcactttgg gaggtcaagg	120
	c	121
	<210> 12	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	

	<222> (61).. (61)	
	<223> Y=T/G	
	<400> 12	
	tgtgatatga tggcatatc atagcacagg gctgttgga ggattaaatg agttgattca	60
	ygtaaaccagg gacatccgaa aaagggaaag acgggtcctg tctgagaac agctgtgaat	120
	g	121
	<210> 13	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> Y=A/G	
	<400> 13	
	aggtgagtgg ccttaaaggg gaaggagaaa ccttttgaaa gcaggacagg tcctctctga	60
	ytcatccccg tatgggtaaa tctacatcac tagcttcatt actgactggt ccatgtagaa	120
	a	121
	<210> 14	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0004]	<220>	
	<221> y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> Y=A/G	
	<400> 14	
	caggtatgtc ttcaaaccta tgatggataa aagttacagt cagcacagat tgaagcacc	60
	ytctgttgaa acgcagctcc gtcttgctct ctggagagga ctcactctg gaaagttgag	120
	a	121
	<210> 15	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (61).. (61)	
	<223> y=A/G	
	<400> 15	
	tgtaaccaag taaccaatgg taaaccteta cagggtatta aggctccaga aaattctcta	60
	ytcaaccact tgetctgct cgagcctgct ccaactccgt ggagtgtact ttcatttcag	120
	t	121
	<210> 16	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	

	<221> y	
	<222> (27)..(27)	
	<223> y=C/G/T	
	<400> 16	
	tttgggtga cgaaaatgta aaattaygtt gtggtgatgg ttgcacaaca cc	52
	<210> 17	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (27)..(27)	
	<223> y=G/T	
	<400> 17	
	gaataaccac acacatggac cctgggytcc aagttcatta gaatggetct tt	52
	<210> 18	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (27)..(27)	
	<223> Y=G/T	
[0005]	<400> 18	
	aagacagagg aacccccata ggctgggygt gagcaggggg catgagggt aa	52
	<210> 19	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> y	
	<222> (27)..(27)	
	<223> y=c/t	
	<400> 19	
	tgccaacta tttctttctt tcttttytga gatgggggtc teactgtgtt gg	52
	<210> 20	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (27)..(27)	
	<223> X = C/T	
	<400> 20	
	ttaacctatt tattttcttc aaccctyagc ccagatccta accttcggtg ag	52



B. ADCY9 区中的 SNP

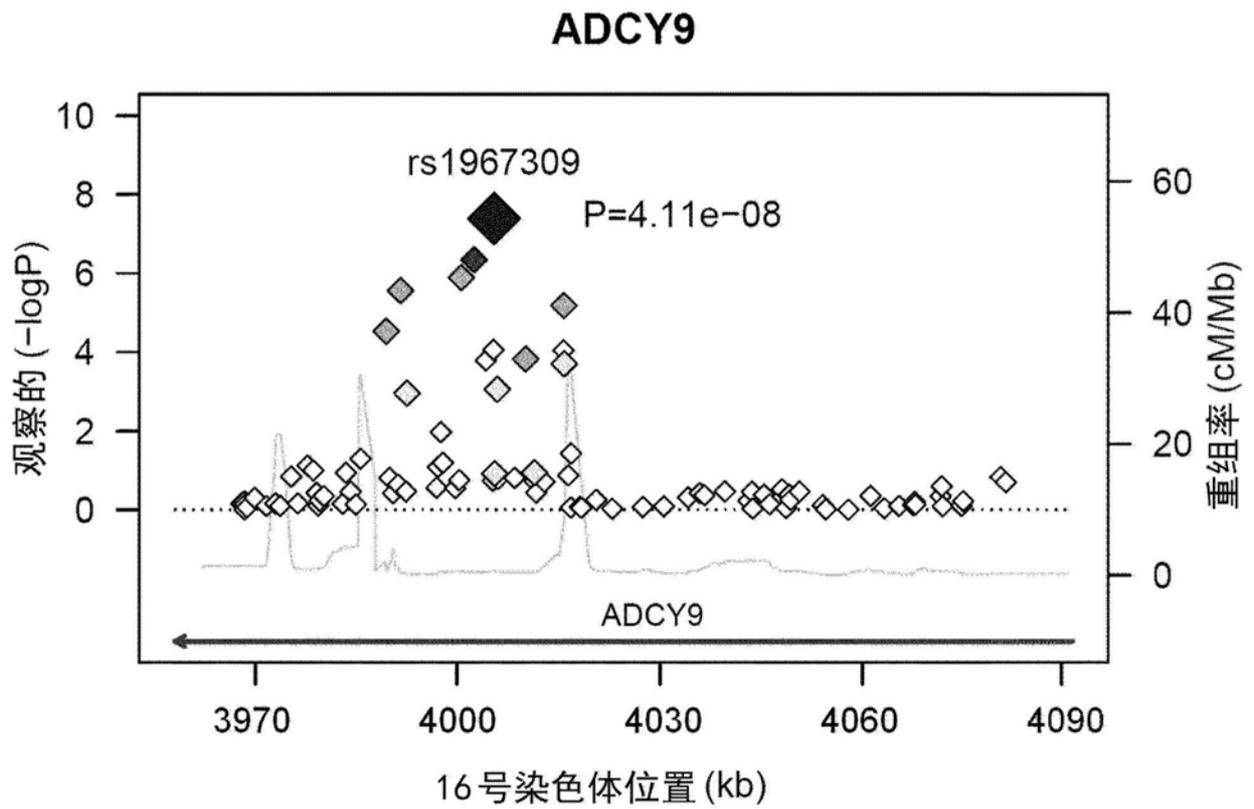


图1

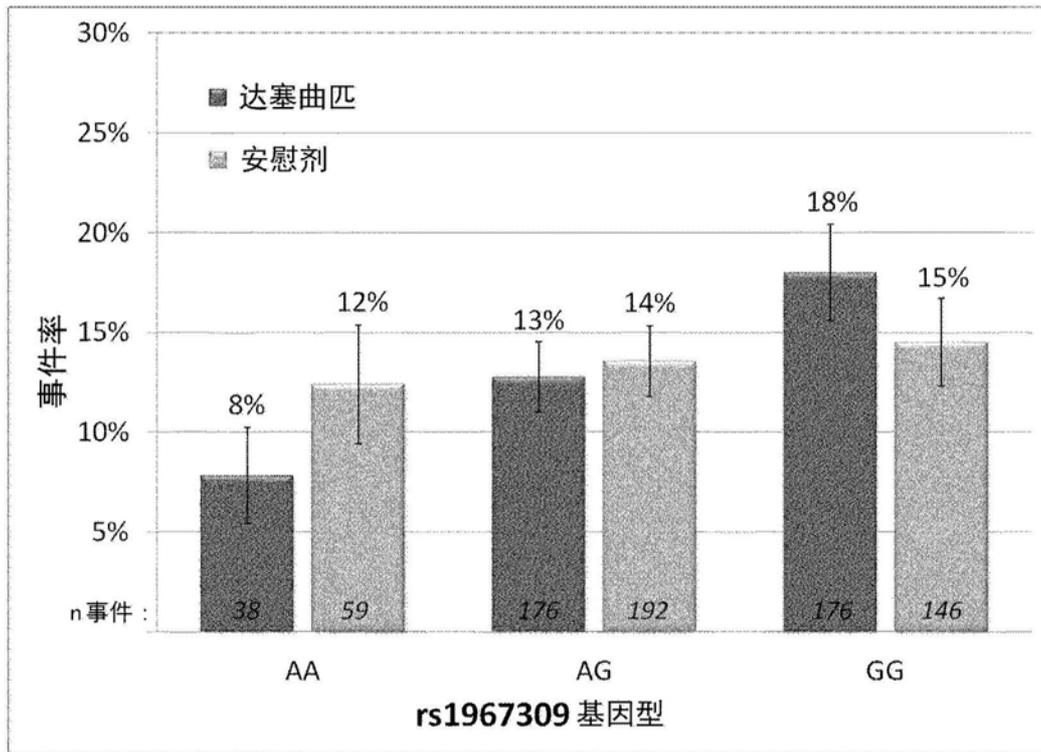


图2

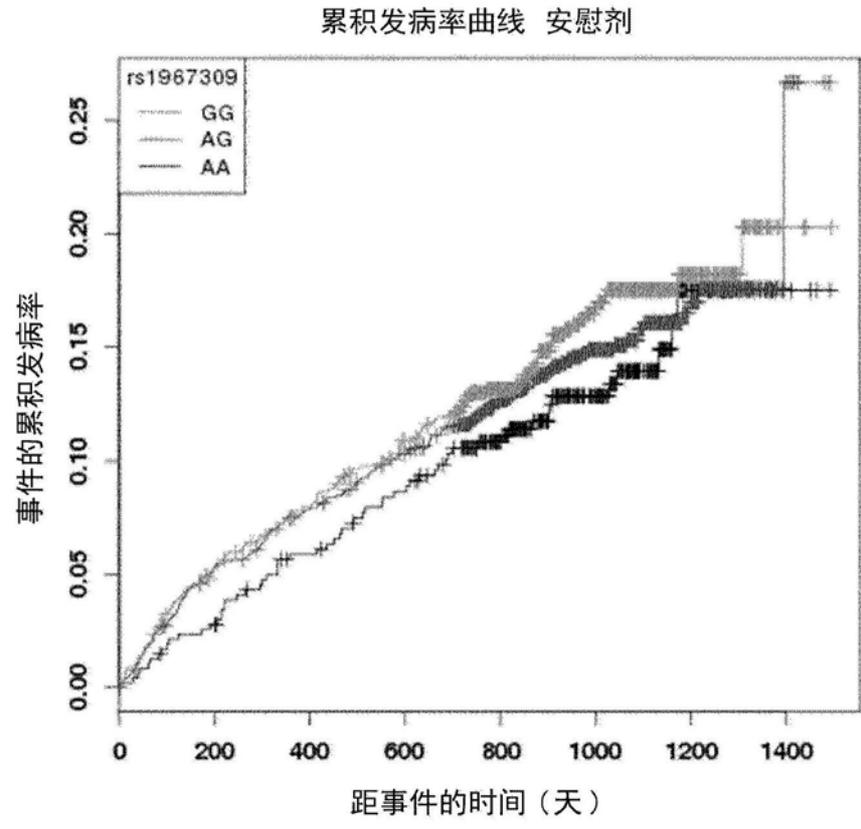
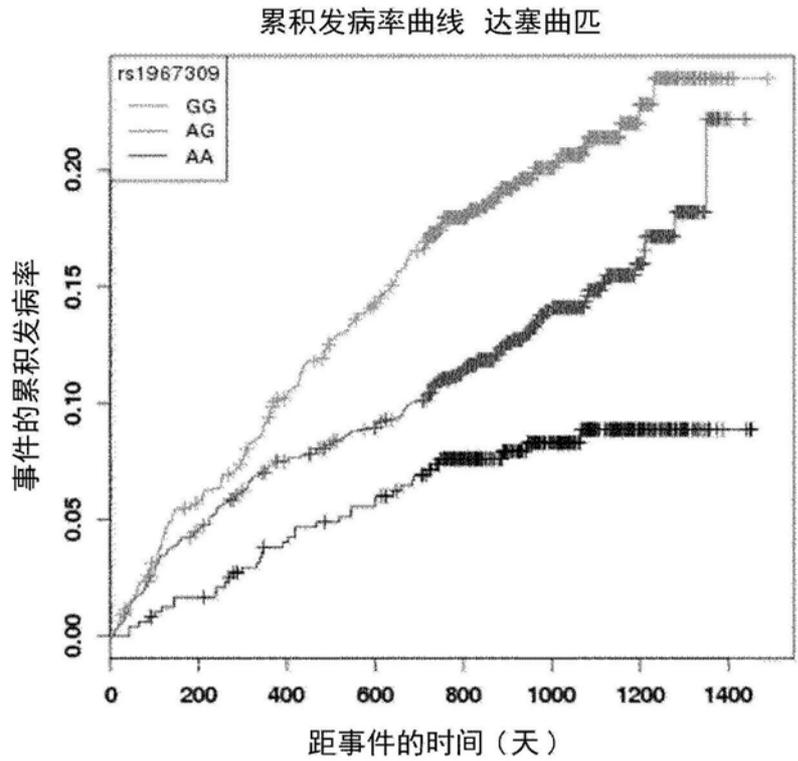
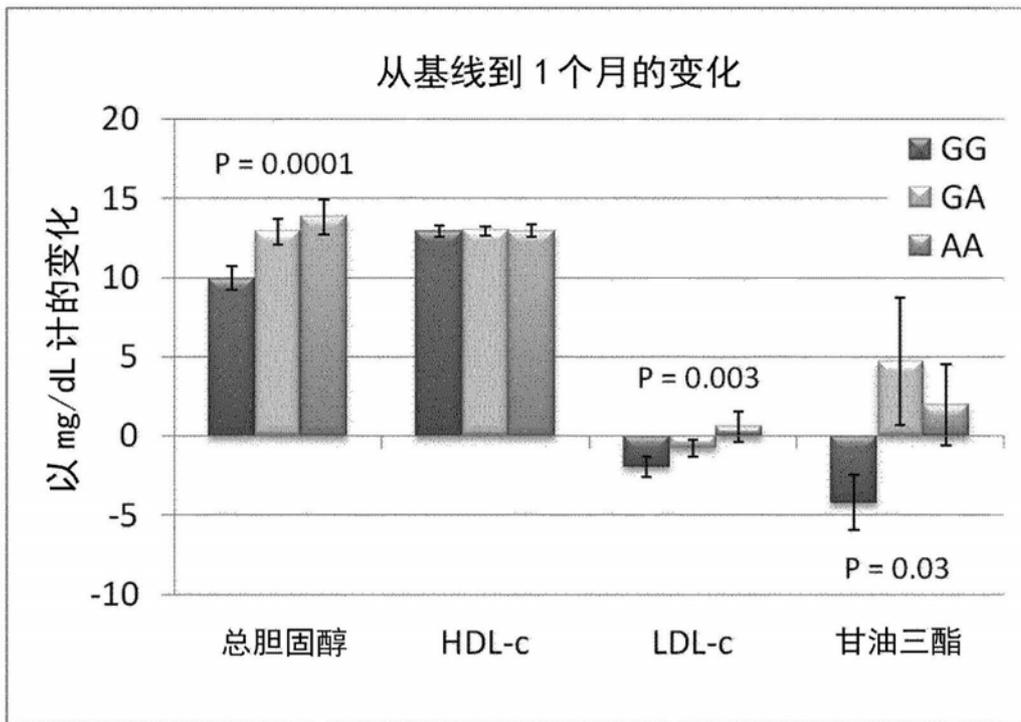


图3

A.



B.

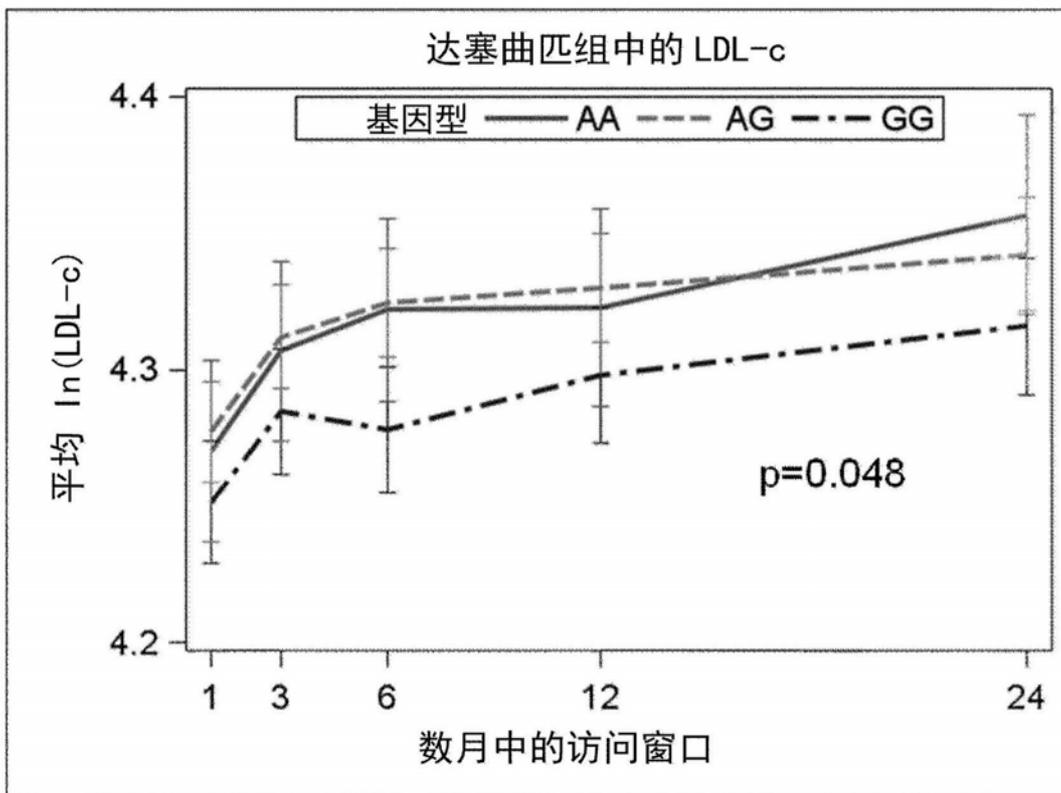


图4

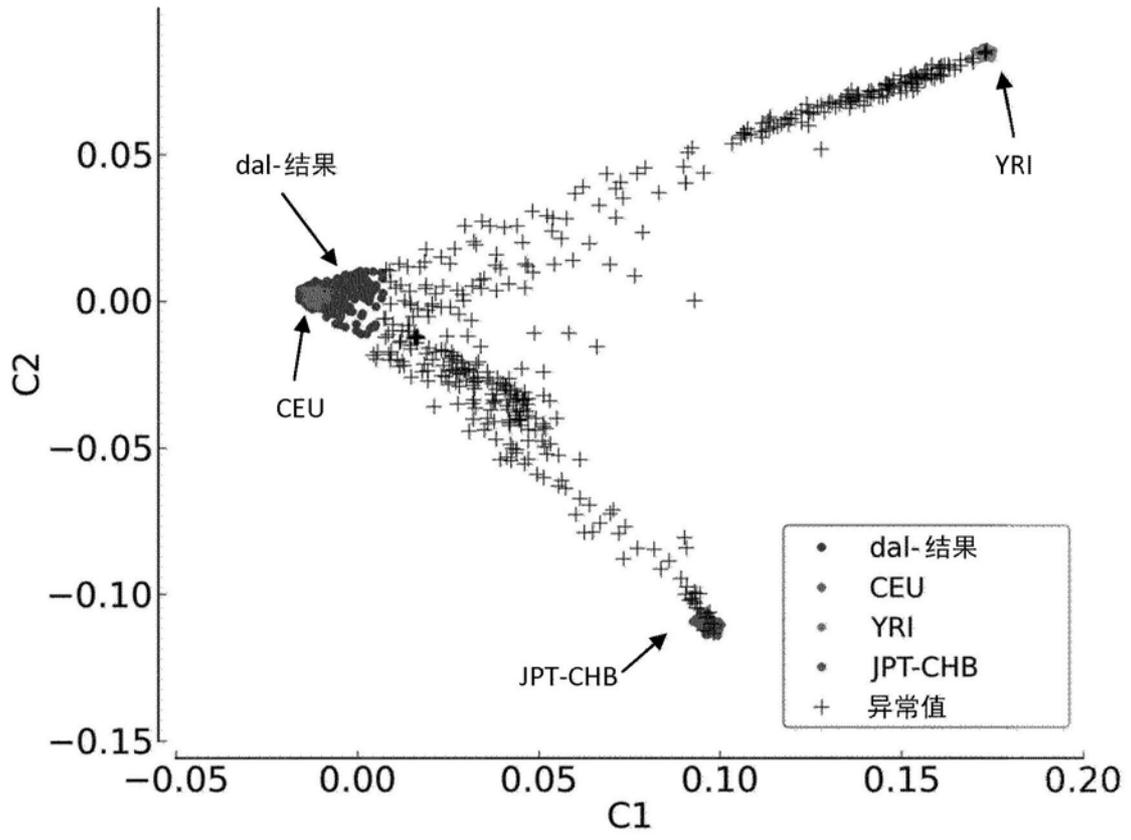


图5

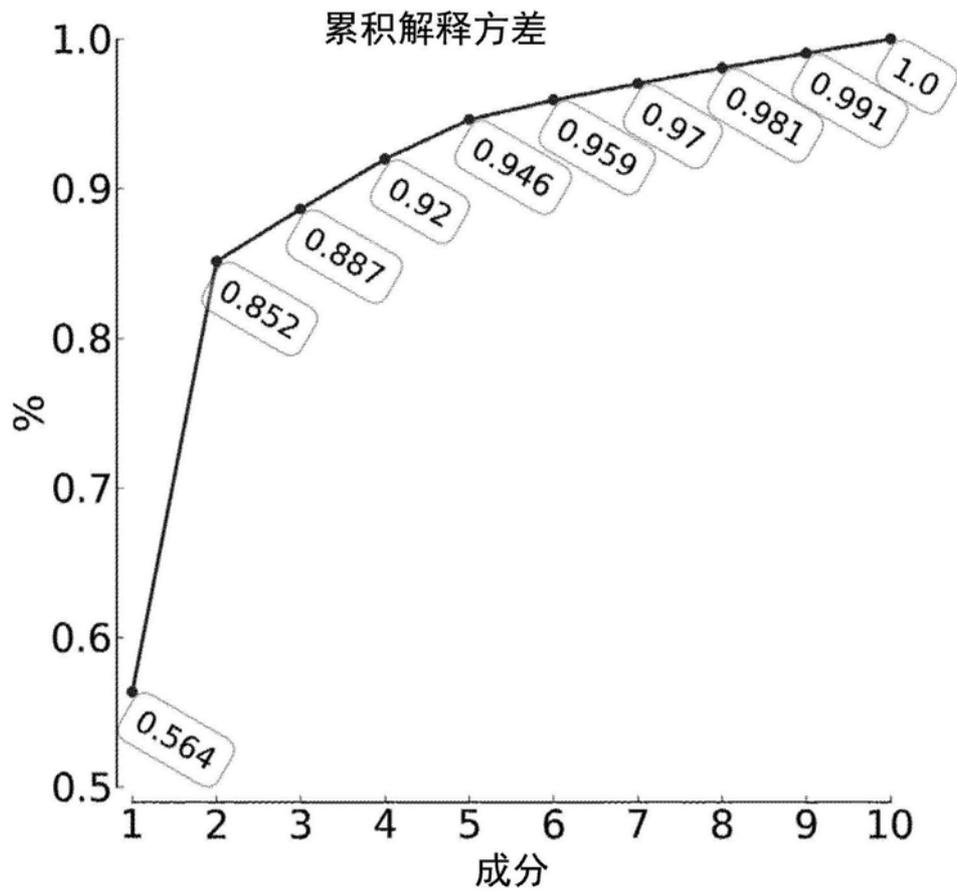


图6

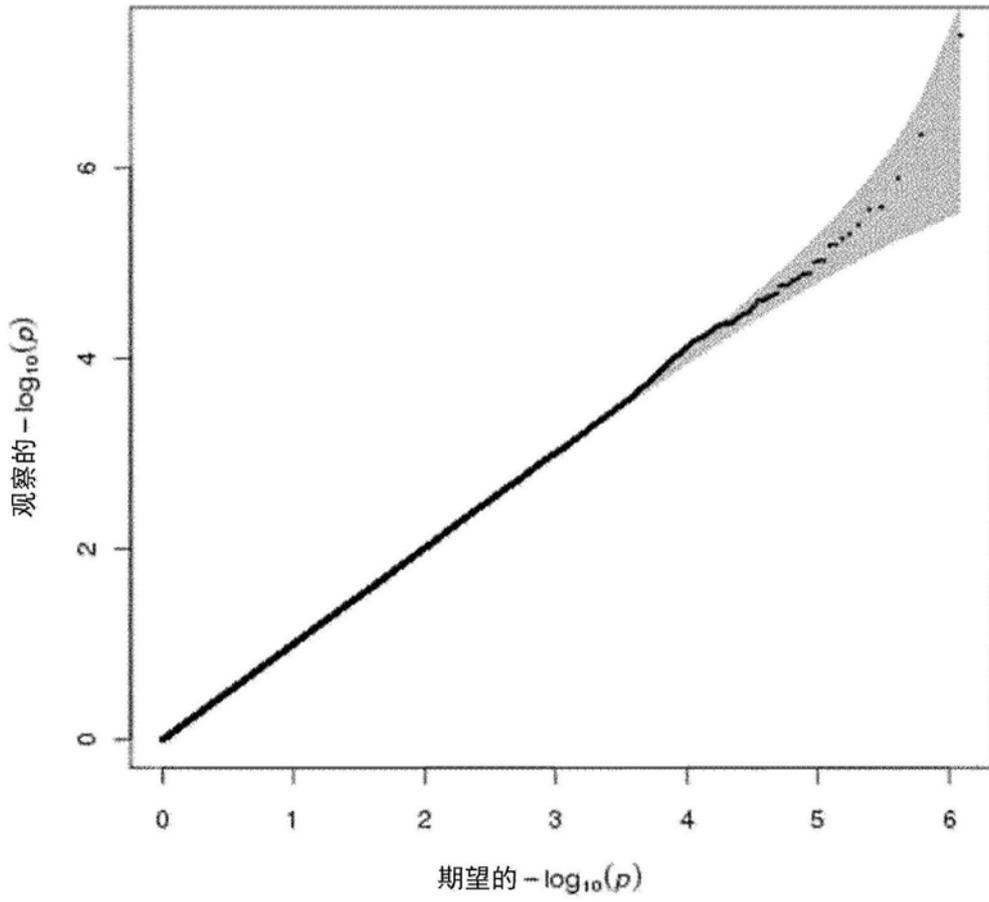


图7

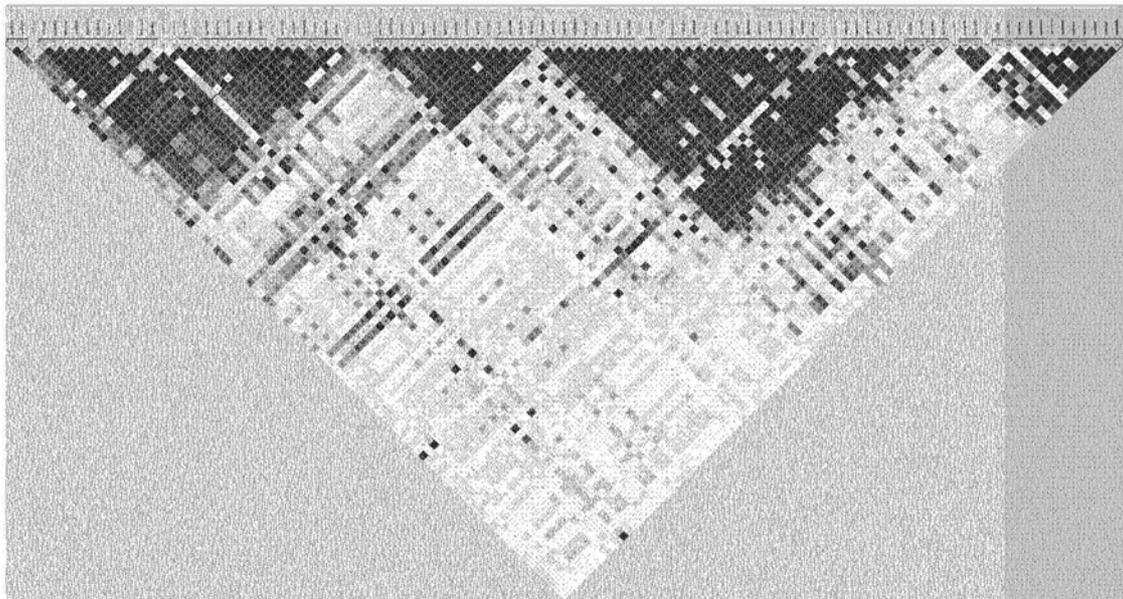


图8