

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 344 396**

21 Número de solicitud: 200900507

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

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **24.02.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2010**

Fecha de la concesión: **13.06.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **24.06.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

73 Titular/es: **Fina Biotech, S.L.U.**
Camino de las Huertas, 2 - Edificio I
28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, ES

72 Inventor/es: **Fernández Ferri, Patricia;**
Sánchez Fernández, Pedro Luis;
Chaves Martínez, Felipe Javier;
Silvestre Roig, Carlos;
Andrés García, Vicente y
Fernández Avilés, Francisco

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **Marcadores genéticos del riesgo de sufrir reestenosis.**

57 Resumen:

Marcadores genéticos del riesgo de sufrir reestenosis.
La presente invención contempla un método para la determinación del riesgo de un individuo de sufrir reestenosis tras la implantación de un stent basado en el análisis de una muestra para determinar el genotipo en al menos un polimorfismo de base única (SNP) seleccionado entre rs350099, rs350104, rs164390 y rs875459, en el gen CCNB1, y, opcionalmente de rs2282411 y/o rs733590, en los genes CCNA1 y CDKN1A, respectivamente, donde la presencia de determinados alelos en alguno de estos polimorfismos es indicativa del riesgo de sufrir reestenosis.

ES 2 344 396 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Marcadores genéticos del riesgo de sufrir reestenosis.

5 **Campo de la invención**

La presente invención tiene su aplicación dentro del sector sanitario, en el campo de la Biología Molecular. En concreto, esta invención está dirigida a un método de diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis tras revascularización mediante implantación de *stent* basado en la detección de polimorfismos de base única (SNPs).

10 **Antecedentes de la invención**

El tratamiento más frecuentemente utilizado en clínica para la revascularización de vasos afectados de arteriosclerosis es la angioplastia percutánea transluminal (APCT). Un proceso patológico frecuentemente asociado a esta intervención es la reestenosis, consistente en la reoclusión excesiva del vaso intervenido. La reestenosis tiene un elevado impacto sanitario y socio-económico, pues obliga a repetir la APCT o a someter al paciente afectado a terapias alternativas de revascularización (por ejemplo, “by-pass” aortocoronario). En comparación con la lesión ateromatosa nativa, caracterizada por un lento desarrollo (típicamente a lo largo de décadas), la lesión reestenótica suele crecer durante los primeros 4-12 meses después de la APCT (*Serruys, Kutryk and Ong, “Coronary-artery stents”, N Engl J Med 2006, 354, 483-95*). Actualmente más del 90% de las APCT utilizan endoprótesis metálicas de soporte denominadas *stents* que aumentan la seguridad del procedimiento de intervención y han reducido las tasas de reestenosis a un 15-30%, comparado con tasas del 25-50% típicamente asociadas a APCT convencional (*Serruys, Kutryk and Ong, “Coronary-artery stents”, N Engl J Med 2006, 354, 483-95*, *Andrés, “Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential”, Cardiovasc Res 2004, 63, 11-21*). Las tasas de reestenosis se reducen aún más con el uso de *stents* liberadores de fármacos.

La reestenosis es un proceso multifactorial en el que intervienen diversos tipos celulares, principalmente plaquetas, monocitos/macrófagos, células endoteliales (CEs), y células musculares lisas (CMLs). Se acepta que el crecimiento de la lesión reestenótica, también llamada lesión neointima, es un proceso iniciado por el daño mecánico que provoca la implantación del *stent* (*Andrés, “Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential”, Cardiovasc Res 2004, 63, 11-21*, *Costa and Simon, “Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents”, Circulation 2005, 111, 2257-73*). La fase aguda inicial de la reestenosis supone una activación plaquetaria y trombosis localizada, acompañada del reclutamiento de monocitos, neutrófilos y linfocitos circulantes en la superficie arterial dañada. Estos tipos celulares desencadenan una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por la activación de las CMLs residentes en la túnica media, las cuales adoptan un fenotipo “sintético” caracterizado por cambios morfológicos, expresión de isoformas embrionarias de proteínas contráctiles, alta capacidad de respuesta a estímulos de crecimiento y quimiotácticos, y síntesis abundante de matriz extracelular. Una plétora de factores quimiotácticos y mitogénicos producidos por las células de la lesión neointima provoca una primera fase proliferativa de las CMLs de la media y su migración hacia la lesión, seguida por una segunda respuesta hiperplásica de las CMLs de la lesión neointima (*Andrés, “Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential”, Cardiovasc Res 2004, 63, 11-21*, *Costa and Simon, “Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents”, Circulation 2005, 111, 2257-73*). La resolución de la inflamación y cicatrización de la lesión vascular en etapas posteriores de la APCT va acompañada de la restauración del fenotipo contráctil de las CMLs de la neointima y cambios en la composición de la matriz extracelular que se asemeja más a la pared arterial no dañada. Como se ha indicado anteriormente, si la reestenosis es excesiva reaparecen los síntomas clínicos obligando a una nueva intervención revascularizante.

Entre los reguladores de la hiperplasia de la neointima identificados en estudios animales y humanos se incluyen factores trombogénicos (por ejemplo, el factor tisular, receptor de la trombina), moléculas de adhesión celular (por ejemplo, VCAM, ICAM, LFA-1, Mac-1), transductores de señales (por ejemplo, PI3K, MEK/ERK), factores de transcripción (por ejemplo, NF- κ B, E2F, AP-1, c-myc, c-myb, YY1, Gax), proteínas reguladoras del ciclo celular (por ejemplo, pRb, p21, p27, CDK2, CDC2, ciclina B1, PCNA), factores de crecimiento (por ejemplo, PDGF-BB, TGF β , FGF, IGF, EGF, VEGF), citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TNF α), factores de quimiotaxis (por ejemplo, CCR2, MCP-1), y metaloproteasas (por ejemplo, la MMP-2, MMP-9).

El carácter esencialmente hiperproliferativo de la reestenosis ha generado un gran interés en el estudio del papel que pueden jugar en este proceso patológico los genes reguladores del ciclo celular. En mamíferos, el ciclo celular se regula positivamente por holoenzimas compuestos por una subunidad catalítica denominada quinasa dependiente de ciclina (CDK, cyclin-dependent kinase) y una subunidad reguladora denominada ciclina (*Ekholm and Reed, “Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle”, Curr Opin Cell Biol 2000, 12, 676-84*). La activación secuencial de las CDK/ciclinas permite diversos eventos de fosforilación de sustratos celulares implicados en la proliferación celular. Por otro lado, existen proteínas inhibitoras de CDKs/ciclinas denominadas CKIs (CDK inhibitors), las cuales se subdividen en las subfamilias CIP/KIP (p21, p27 y p57) e INK4 (p15, p16, p18, y p19). La acumulación de CKIs en respuesta a estímulos anti-mitogénicos provoca la inhibición reversible de los complejos CDK/ciclina. La importancia de estas moléculas en el desarrollo de la lesión neointima se ha puesto de manifiesto gracias a estudios de expresión y experimentos de terapia génica. Así, el análisis de lesiones vasculares obstructivas inducidas por daño mecánico en modelos animales y humanos de angioplastia ha revelado alteraciones en la expresión de genes reguladores del ciclo celular (por ejemplo, CDKs, ciclinas, CKIs, p53, pRb), y numerosos estudios en anima-

les experimentales han demostrado que la inactivación de CDKs y ciclinas (por ejemplo, ciclina B, CDK2, CDK1), o la sobreexpresión de supresores de crecimiento (por ejemplo p21, p27, pRb, p53) inhibe el desarrollo de lesiones vasculares obstructivas tras angioplastia (Andrés, “Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential”, *Cardiovasc Res* 2004, 63, 11-21, Nabel, “CDKs and CKIs: molecular targets for tissue remodelling”, *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1, 587-98, Dzau, Braun-Dullaeus and Sedding, “Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies”, *Nat Med* 2002, 8, 1249-56).

Numerosos abordajes terapéuticos de carácter sistémico para la prevención o tratamiento de la reestenosis que mostraron resultados alentadores en modelos animales no han dado resultados satisfactorios en ensayos clínicos. Sin embargo, la reciente introducción de los *stents* liberadores de drogas antiproliferativas (ST-DA) ha revolucionado la cardiología intervencionista. Cabe destacar el uso de *stents* liberadores de sirolimus (también llamado rapamicina o rapamune) y de paclitaxel (también llamado taxol), fármacos lipofílicos que tienen como diana la ruta final común de la proliferación celular, el ciclo de la célula eucariota. Estos dispositivos liberan dosis elevadas del fármaco de un modo localizado en la pared arterial dañada y su uso ha reducido muy significativamente las tasas de reestenosis (Costa and Simon, “Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents”, *Circulation* 2005, 111, 2257-73, Wessely, Schomig and Kastrati, “Sirolimus and Paclitaxel on polymer-based drug-eluting stents: similar but different”, *J Am Coll Cardiol* 2006, 47, 708-14). Por este motivo, actualmente en Europa se implantan 2 ST-DAs de cada 3 *stents* implantados (Baz, Mauri, Albarran and Pinar, “[Spanish Cardiac Catheterization and Coronary Intervention Registry. 16th Official Report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Cardiac Catheterization and Interventional Cardiology (1990-2006)]”, *Rev Esp Cardiol* 2007, 60, 1273-89). Entre los inconvenientes del uso de ST-DA respecto a los *stents* convencionales destacan su elevado coste (2-3 veces superior) y la necesidad de prolongar el tratamiento antiplaquetario para evitar eventos adversos asociados a trombosis tardía (revisado en Lázaro y de Mercado, “Stents recubiertos de fármacos: eficacia, efectividad, eficiencia y evidencia”, *Revista Española de Cardiología* 2004, 57, 608-12).

Debido al elevado impacto sanitario y socio-económico de la reestenosis, resultaría de gran utilidad disponer de biomarcadores que pudieran cuantificarse de un modo reproducible, fiable y costo-efectivo en pacientes necesitados de revascularización. La posibilidad de estimar el riesgo de reestenosis en estos pacientes podría ayudar a tomar decisiones terapéuticas, por ejemplo, implantación de *stent* versus “*by-pass*” ortocoronario, o uso de *stent* convencional versus ST-DA (más caros y con riesgo aumentado de trombosis tardía).

Los polimorfismos de base única (SNP: single nucleotide polymorphism) son variantes genéticas presentes por millones a lo largo del genoma humano. En los últimos años se han identificado SNPs en diversos genes humanos que se asocian con la susceptibilidad a desarrollar reestenosis, incluyendo el gen del receptor beta2-adrenérgico, CD14, factor de estimulación de colonias (CSF: colony stimulating factor), eotaxina, caspasa-1, receptor P2RY12, interleuquina-10 que han mostrado asociación con mayor o menor riesgo de sufrir reestenosis (Monraats et al. “Inflammation and apoptosis genes and the risk of restenosis after percutaneous coronary intervention”, *Pharmacogenet Genomics* 2006, 16, 747-754; Monraats et al. “Interleukin 10: a new risk marker for the development of restenosis after percutaneous coronary intervention”, *Genes Immun* 2007, 8, 44-50; Monraats et al. “Genetic inflammatory factors predict restenosis after percutaneous coronary interventions”, *Circulation* 2005, 112, 2417-25; Rudez et al. “Platelet receptor P2RY12 haplotypes predict restenosis after percutaneous coronary interventions”, *Hum Mutat* 2008, 29, 375-80).

Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún tipo de asociación genotipo-fenotipo que relacione SNPs en genes reguladores del ciclo celular con mayor o menor riesgo de desarrollar reestenosis.

Los autores de la presente invención, tras una importante labor de investigación, han identificado diferentes SNPs en diversos genes reguladores del ciclo celular con potencial diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis. Concretamente, han identificado los SNPs rs164390, rs350099, rs350104, rs875459, en el gen CCNB1 (proteína ciclina B1); rs2282411, en el gen CCNA1 (proteína ciclina A1) y rs733590, en el gen CDKN1A (proteína p21Kip1/Cip1) como marcadores de diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis.

Estos marcadores constituyen un avance muy importante en la toma de decisiones terapéuticas. Por ejemplo, los pacientes con bajo riesgo relativo de reestenosis podrían recibir un *stent* convencional, mientras que el uso de ST-DA (más caros y con mayor riesgo de trombosis tardía) podría limitarse a los pacientes con mayor riesgo.

En base a estos hallazgos, los autores de la invención han desarrollado un método para determinar el riesgo de reestenosis tras la implantación de un *stent* basado en la detección de estos 6 SNPs como marcadores de diagnóstico de dicho riesgo. Asimismo, han desarrollado un kit para llevar a cabo dicho diagnóstico.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Tabla resumen de los 25 polimorfismos analizados en genes de ciclinas.

Fig. 2: Tabla resumen de los 22 polimorfismos analizados en genes supresores de crecimiento celular.

Fig. 3: Tabla resumen de los 6 SNPs asociados de forma estadísticamente significativa con riesgo de reestenosis tras la implantación de un *stent*.

ES 2 344 396 B1

Fig. 4: Tabla de los resultados del análisis de regresión logística utilizando el programa SNPStat de los SNPs asociados con riesgo de reestenosis tras la implantación de un *stent*.

Fig. 5: Esquema de la localización de los SNPs rs350099 (SNP1) y rs350104 (SNP2) y la secuencia de unión a NF-Y (NF-Y bs) en el promotor del gen CCNB1 humano.

Fig. 6: Relación de sondas utilizadas en los ensayos de movilidad electroforética retardada (“*Electrophoretic Mobility Shift Assay*”, EMSA).

Fig. 7: Ensayo de EMSA resultado de la incubación de las sondas NF-Ycons, SNP1-T y SNP1-C marcadas radiactivamente y extractos de la fracción nuclear soluble de células humanas derivadas de cáncer cervical (HeLa). Los ensayos de “supershift” (super-retardo) se realizaron mediante la incubación con los anticuerpos anti-NF-YB y anti-CREBII (este último utilizado como control de especificidad).

Fig. 8: Ensayo de competición realizado mediante la técnica de EMSA resultado de la incubación de extractos de la fracción nuclear soluble de células humanas derivadas de cáncer cervical (HeLa) con la sonda NF-Y cons marcada radiactivamente y un exceso de los oligonucleótidos de doble cadena NF-Ycons, NF-Ymut, SNP1-T y SNP1-C no marcadas radiactivamente.

Fig. 9: Ensayo de competición realizado mediante la técnica de EMSA resultado de la incubación de extractos de la fracción nuclear soluble de células humanas derivadas de cáncer cervical (HeLa) con la sonda NF-Y (-30/-10) marcada radiactivamente y un exceso de los oligonucleótidos de doble cadena NF-Y (-30/-10), SNP1-T y SNP1-C no marcadas radiactivamente.

Fig. 10: a) Ensayo de competición realizado mediante la técnica de EMSA resultado de la incubación de extractos de la fracción nuclear soluble de células epiteliales de osteosarcoma humano (“Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells”, U2OS) con la sonda AP-1cons marcada radiactivamente y un exceso de los oligonucleótidos de doble cadena AP-1cons, SNP2-C y SNP2-T no marcadas radiactivamente, b) Intensidades relativas de los complejos ADN-proteína de una media de cinco EMSAs y el análisis estadístico mediante ANOVA de un factor y corrección de Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, intensidad de banda en ensayo con competidor versus intensidad de banda sin competidor.

Fig. 11: Secuencias de nucleótidos adyacentes a los 6 SNPs que muestran asociación estadísticamente significativa con riesgo de reestenosis tras la implantación de un *stent*.

Fig. 12: Curvas de disociación del SNP1. a) Representación de las curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura), b) Representación de la diferencia entre curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura). Las diferencias en las curvas de disociación son resultado de las diferencias entre variaciones en la secuencia de los productos de PCR, agrupándose las muestras en función de cada genotipo.

Fig. 13: Curvas de disociación del SNP2. a) Representación de las curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura), b) Representación de la diferencia entre curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura). Las diferencias en las curvas de disociación son resultado de las diferencias entre variaciones en la secuencia de los productos de PCR, agrupándose las muestras en función de cada genotipo.

Fig. 14: Curvas de disociación del SNP3. a) Representación de las curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura), b) Representación de la diferencia entre curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura). Las diferencias en las curvas de disociación son resultado de las diferencias entre variaciones en la secuencia de los productos de PCR, agrupándose las muestras en función de cada genotipo.

Fig. 15: Curvas de disociación del SNP4. a) Representación de las curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura), b) Representación de la diferencia entre curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura). Las diferencias en las curvas de disociación son resultado de las diferencias entre variaciones en la secuencia de los productos de PCR, agrupándose las muestras en función de cada genotipo.

Fig. 16: Curvas de disociación del SNP5. a) Representación de las curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura), b) Representación de la diferencia entre curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura). Las diferencias en las curvas de disociación son resultado de las diferencias entre variaciones en la secuencia de los productos de PCR, agrupándose las muestras en función de cada genotipo.

Fig. 17: Curvas de disociación del SNP6. a) Representación de las curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura), b) Representación de la diferencia entre curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura). Las diferencias en las curvas de disociación son resultado de las diferencias entre variaciones en la secuencia de los productos de PCR, agrupándose las muestras en función de cada genotipo.

Objeto de la invención

Es objeto de la invención un método para la determinación del riesgo de un individuo de sufrir reestenosis tras la implantación de un stent basado en el análisis de una muestra para determinar el genotipo en al menos un polimorfismo de base única (SNP) seleccionado entre rs350099, rs350104, rs164390 y rs875459, en el gen CCNB1, y, opcionalmente de rs2282411 y/o rs733590, en los genes CCNA1 y CDKN1A, respectivamente, donde la presencia de determinados alelos en alguno de estos polimorfismos, tal y como se indica más abajo, es indicativa del riesgo de sufrir reestenosis.

Es asimismo objeto de la invención un kit para llevar a cabo dicho método que comprende un set de sondas y reactivos adecuados para la determinación del genotipo de los polimorfismos citados.

Finalmente, es objeto de la invención el empleo de uno o más de los polimorfismos citados, rs350099, rs350104, rs164390, rs875459 y, opcionalmente, rs2282411 y rs733590, como marcadores del riesgo de un individuo de sufrir reestenosis tras la implantación de un *stent*.

Descripción de la invención

En un aspecto principal de la invención se contempla un método para la determinación del riesgo de un individuo de sufrir reestenosis tras la implantación de un *stent* que comprende: a) obtener el ADN genómico de una muestra del individuo; b) analizar el ADN de la muestra para determinar el genotipo de al menos un polimorfismo de base única (SNP) en el gen CCNB1, seleccionado entre rs350099 (SNP1), rs350104 (SNP2), rs164390 (SNP3) y rs875459 (SNP4), tal y como se definen en la figura 3, donde la presencia de determinados alelos en alguno de estos polimorfismos, tal y como se definen a continuación, es indicativa del riesgo de sufrir reestenosis (Ver figura 4).

En una realización preferida, el paso b) comprende analizar el ADN de la muestra para determinar la combinación de genotipos de los polimorfismos SNP1 y SNP2.

El Polimorfismo rs350099 (SNP1) (Ver figura 3), está localizado en la región promotora, a -957 del inicio de la transcripción del gen CCNB1, que codifica para la proteína ciclina B1, un regulador positivo esencial para la proliferación celular en varios contextos fisiopatológicos (*Santamaria and Ortega, "Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice", Front Biosci 2006, 11, 1164-88*), incluyendo el desarrollo de la lesión neointima inducida por daño vascular mecánico (*Morishita, Gibbons, Kaneda, Ogihara and Dzau, "Pharmacokinetics of antisense oligodeoxyribonucleotides (cyclin B1 and CDC 2 kinase) in the vessel wall in vivo: enhanced therapeutic utility for restenosis by HVJ-liposome delivery", Gene 1994, 149, 13-9*). La posición -957 se corresponde a su vez con la base en posición 36 de la secuencia de 1172 pares de bases (pb) del gen CCNB1 (número de acceso U22364 en la base de datos GenBank). Su uso como marcador diagnóstico de riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de stent en un ser humano, viene determinado por la detección del alelo T en homocigosis (genotipo T/T) de este SNP (Ver figura 4). Además, los autores de la presente invención, en la secuencia con el alelo T, han identificado una secuencia (CCAAT) que constituye un sitio de unión específico para el factor transcripcional NF-Y (Ver figuras 7-9)).

El factor de transcripción NF-Y, a través de su unión a dos secuencias cis-reguladoras localizadas en la región -150 a +182 del promotor del gen CCNB1 humano, es esencial para su activación transcripcional en células con elevada tasa proliferativa (*Sciortino, Gurtner, Manni, Fontemaggi, Dey, Sacchi, Ozato and Piaggio, "The cyclin B1 gene is actively transcribed during mitosis in HeLa cells", EMBO Rep 2001, 2, 1018-23*, Fariña, Manni, Fontemaggi, Tiainen, Cenciarelli, Bellowini, Mantovani, Sacchi and Piaggio, "Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex", *Oncogene 1999, 18, 2818-27*).

La figura 5 muestra un esquema de la región promotora del gen CCNB1 humano con la localización de los SNPs estudiados mediante el ensayo de EMSA (SNP1 y SNP2). La caja NF-Ybs representa la región CCAAT, sitio de unión del factor transcripcional NF-Y, situado en la posición -21/-17 del promotor. El inicio de la transcripción se designa con el valor +1 y se encuentra representado con la flecha curvada.

El polimorfismo rs350104 (SNP2), (Ver figura 3), está localizado en la región promotora, a -475 del inicio de la transcripción del gen CCNB1, que codifica para la proteína ciclina B1. La posición -475 se corresponde a su vez con la base en posición 519 de la secuencia de 1172 pb del gen CCNB1 (Número de acceso U22364 en la base de datos GenBank). Su uso como marcador diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de un *stent* en un ser humano, viene determinado por la detección del alelo C en homocigosis (genotipo C/C) de este SNP (Ver figura 4). Además, los autores de la invención han identificado en la secuencia con el alelo C un sitio de unión a AP-1 de mayor afinidad respecto a la secuencia con el alelo T (Ver figura 10).

AP-1 es un factor de transcripción ampliamente relacionado con los procesos reguladores de activación de gran cantidad de genes de ciclo celular, incluyendo ciclinas (*Shaulian and Karin, "AP-1 in cell proliferation and survival", Oncogene 2001, 20, 2390-400*).

El polimorfismo rs164390 (SNP3), (Ver figura 3), está localizado en la posición +102, región 5' no traducida, del gen CCNB1, que codifica para la proteína ciclina B1. La posición +102 se corresponde a su vez con la base en posición 104 de la secuencia de 11160 pb del gen CCNB1 (Número de acceso NC_000005 en la base de datos GenBank). Su

ES 2 344 396 B1

uso como marcador diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis viene determinado por la detección del alelo G en homocigosis (genotipo G/G) de este SNP (Ver figura 4).

El Polimorfismo rs875459 (SNP4), (Ver figura 3), está localizado a +7010 respecto del inicio de la transcripción del gen CCNB1, que codifica para la proteína ciclina B1. La posición +7010 se corresponde a su vez con la base en posición 7012 de la secuencia de 11160 pb del gen CCNB1 (Número de acceso NC_000005 en la base de datos GenBank). Su uso como marcador diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de un *stent* en un ser humano, viene determinado por la detección del alelo G en homocigosis (genotipo G/G) de este SNP (Ver figura 4).

En una realización particular, el paso b) del método comprende adicionalmente determinar el genotipo del polimorfismo rs2282411 (SNP5), del gen CCNA1, tal y como se define en la figura 3.

El Polimorfismo rs2282411 (SNP5), (Ver figura 3), está localizado a +7733 respecto al inicio de la transcripción del gen CCNA1, que codifica para la proteína Ciclina A1, también un regulador positivo del ciclo celular (*Santamaria and Ortega, "Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice", Front Biosci 2006, 11, 1164-88*). La posición +7733 se corresponde a su vez con la base en posición 7735 de la secuencia de 10376 pb del gen CCNA1 (Número de acceso NC_000013 de la base de datos GenBank). Su uso como marcador diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* en un ser humano, viene determinado por la detección del alelo T en homocigosis o en heterocigosis (genotipos TT o CT), en un modelo de codominancia, o bien la detección del alelo G en homocigosis en un modelo de dominancia (genotipo GG), de este SNP (Ver figura 4).

En otra realización particular, el paso b) del método comprende adicionalmente determinar el genotipo del polimorfismo rs733590 (SNP6), del gen CDKN1A, tal y como se define en la figura 3.

El Polimorfismo rs733590 (SNP6), (Ver figura 3), está localizado en la región promotora, a -1284 del inicio de la transcripción del gen CDKN1A, que codifica para la proteína p21^{Kip1/Cip1}, un regulador negativo del ciclo celular en diversos contextos fisiopatológicos (*Massague, "G1 cell-cycle control and cancer", Nature 2004, 432, 298-306*), incluyendo el desarrollo de la lesión neointima inducida por daño vascular mecánico (*Andrés, "Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential", Cardiovasc Res 2004, 63, 11-21, Nabel, "CDKs and CKIs: molecular targets for tissue remodelling", Nat Rev Drug Discov 2002, 1, 587-98*). La posición -1284 se corresponde a su vez con la base en posición 57 de la secuencia de 10907 pb del gen CDKN1A (Número de acceso: AF497972 de la base de datos GenBank). Su uso como marcador diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* en un ser humano, comprende la detección del alelo T en homocigosis (genotipo T/T), tanto en un modelo dominante como codominante, de este SNP (Ver figura 4).

En la figura 11 se muestran las 6 secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO 1-6) adyacentes a los 6 SNPs (SNP1-SNP6), según información registrada en la base de datos pública GenBank ("National Center of Biotechnology Information", NCBI). Las dos variantes polimórficas de cada SNP se muestran entre paréntesis.

El método puede aplicarse a ADN obtenido a partir de distintas muestras de los pacientes, como saliva, sangre o leucocitos purificados a partir de sangre.

El genotipado de los SNPs objeto de esta invención se utiliza en el desarrollo de un kit de diagnóstico del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent*. Las metodologías más apropiadas para la determinación de los SNPs son la minisequenciación (utilización de sondas previas a los polimorfismos y extensión con ddNTPs marcados fluorescentemente para visualizarlos en un secuenciador automático); la PCR cuantitativa (amplificación de la región donde se encuentra cada polimorfismo e identificarlos bien mediante diferentes tipos de sondas, o bien mediante curvas de disociación); la PCR y digestión por restricción (utilización como cebadores en la reacción de PCR oligonucleótidos modificados para crear sitios de restricción para amplificar la región donde está el polimorfismo y digestión con la enzima de restricción apropiada para su visualización con un secuenciador automático, geles de agarosa, etc.); y la amplificación alelo-específica y visualización en un secuenciador, geles de agarosa, etc.

De forma preferida, para la determinación de estos polimorfismos se ha utilizado la metodología de curvas de disociación mediante el sistema de "high resolution melting curves", en la cual se amplifica el ADN de la región donde se encuentran los polimorfismos de interés y se analizan las curvas de disociación en un termociclador cuantitativo. Se trata de una metodología sencilla, rápida y fiable, consistente en la amplificación con oligonucleótidos adecuados de la región que contiene los polimorfismos, siendo estos últimos posteriormente identificados mediante curvas de disociación obtenidas al someter el producto obtenido a una rampa de temperatura según las características del sistema utilizado. Esto permite desarrollar de forma sencilla y fiable las pruebas diagnósticas.

Así, en otro aspecto principal de la invención se contempla el kit para llevar a cabo el método de la invención que comprende un set de oligonucleótidos y reactivos adecuados para la determinación del genotipo de un polimorfismo del gen CCNB1, seleccionado entre SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, y sus combinaciones.

En una realización preferida, el par de oligonucleótidos (cebadores) empleado para el genotipado del SNP1 presenta las secuencias SEQ ID NO 7 (sentido) y SEQ ID NO 8 (antisentido) (Ver tabla 3).

ES 2 344 396 B1

En otra realización preferida, el par de oligonucleótidos empleado para el genotipado del SNP2 presenta las secuencias SEQ ID NO 9 (sentido) y SEQ ID NO 10 (antisentido) (Ver tabla 3).

5 En otra realización preferida, el par de oligonucleótidos empleado para el genotipado del SNP3 presenta las secuencias SEQ ID NO 11 (sentido) y SEQ ID NO 12 (antisentido) (Ver tabla 3).

En otra realización preferida, el par de oligonucleótidos empleado para el genotipado del SNP4 presenta las secuencias SEQ ID NO 13 (sentido) y SEQ ID NO 14 (antisentido) (Ver tabla 3).

10 Opcionalmente, en una realización particular el kit puede incluir además oligonucleótidos adecuados para el genotipado del SNP5, del gen *CCNA1*. De forma preferida, los oligonucleótidos empleados presentan las secuencias SEQ ID NO 15 (sentido) y 16 (antisentido) (Ver tabla 3).

15 En otra realización particular, el kit puede incluir además oligonucleótidos adecuados para el genotipado del SNP6, del gen *CDKN1A*. De forma preferida, los oligonucleótidos empleados presentan las secuencias SEQ ID NO 17 (sentido) y 18 (antisentido) (Ver tabla 3).

20 Finalmente, otro aspecto principal de la invención se refiere al empleo de uno o más de los polimorfismos SNP1, SNP2, SNP3, SNP4 y, opcionalmente, SNP5 y SNP6, tal y como se definen en la figura 3, como marcadores del riesgo de un individuo de sufrir reestenosis tras la implantación de un *stent*.

Ejemplos

25 *Descripción de la cohorte de pacientes*

Población de pacientes

30 Durante un periodo de 12 meses, todos los pacientes admitidos en forma consecutiva a la Clínica Mediterránea (Nápoles, Italia) y que cumplieron los siguientes criterios de inclusión fueron incluidos en el estudio: 1) intervención coronaria percutánea en una arteria coronaria nativa, 2) tratamiento de una lesión de novo, 3) implante de un stent metálico, y 4) disponibilidad de realizar angiografía coronaria al cabo de 6-9 meses. El comité local de ética aprobó el protocolo del estudio y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

35 De los 434 pacientes incluidos en el estudio, solamente se practicó el seguimiento angiográfico a los 6-9 meses a 284 (65%). Estos 284 pacientes representan la población de pacientes.

Determinaciones bioquímicas

40 Los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL (fracción asociada a lipoproteínas de alta densidad), colesterol-LDL (fracción asociada a lipoproteínas de baja densidad) y triglicéridos fueron determinados mediante técnicas enzimáticas. El índice de filtrado glomerular estimado (eGFR) fue calculado mediante la fórmula derivada del estudio MDRD ("Modification of Diet in Renal Disease"). Se consideró enfermedad crónica renal cuando el eGFR era menor a 60 ml/min/1.73 m².

Muestras de sangre

50 Se extrajeron muestras de sangre venosa de los pacientes antes de la intervención coronaria percutánea. Todas las muestras se recogieron en tubos con citrato trisódico como anticoagulante y se colocaron en hielo inmediatamente. En el periodo máximo de una hora después de la extracción, las muestras sanguíneas se centrifugaron a 4000 rpm (1400 g) durante 20 minutos y el plasma fue recogido y guardado en alícuotas a -80°C hasta su posterior análisis.

55 *Angioplastia coronaria percutánea*

Los pacientes recibieron dinitrato de isosorbida (0.1-0.3 mg) intracoronario antes de los angiogramas inicial y final para conseguir la vasodilatación máxima. Las medidas angiográficas se realizaron con un sistema automatizado y computerizado (QCA-CMS versión 3.0, MEDIS, Leiden, The Netherlands). El seguimiento de la reestenosis fue realizado a los 6-9 meses después del implante del stent mediante la determinación del diámetro luminal mínimo (MLD). Además se analizaron las siguientes variables: ganancia aguda, definida como la diferencia de MLD después de la intervención menos el MLD antes de la intervención; pérdida tardía, definida como el MLD después de la intervención menos el MLD en el tiempo de seguimiento; e índice de pérdida, definido como el cociente medio entre la pérdida tardía y la ganancia aguda. Los pacientes se clasificaron como no afectados (sin reestenosis) o afectados (con reestenosis) según el grado de estenosis en el tiempo de seguimiento (<50% o ≥50%, respectivamente).

Análisis estadístico

Las variables continuas se representan como media±desviación estándar (SD). Las diferencias en valores continuos en los dos grupos (definidos en función de la progresión de la lesión angiográfica) se analizaron mediante el test de la t de Student o el test de la U de Mann-Whitney cuando fue apropiado. Las variables categóricas se analizaron mediante el test chi-cuadrado. Los tests fueron realizados de forma bilateral y los datos fueron analizados mediante el programa SPSS para Windows, versión 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

TABLA 1

Características clínicas de los pacientes con o sin reestenosis tras implantación de stent coronario

	Sin reestenosis (n= 168)	Con reestenosis (n= 116)	P
Edad	59 ± 11	63 ± 9	0.002
Varones	75.3%	77.2%	0.71
Angina de pecho *			0.33
Clase I	20.7%	13.6%	
Clase II	61.9%	66.2%	
Clase III	17.4%	20.2%	
Diabetes mellitus	36.4%	35.8%	0.85
Fracción de eyección ventricular izquierda,%	56±10	56±90	0.81
Infarto de miocardio previo	48.5%	47.8%	0.91
Historia familiar de enfermedad arterial coronaria	31.5%	38.2%	0.64
Hipertensión Sistémica	64.6%	57.5%	0.15
Hipercolesterolemia	51.2%	49.1%	0.30
Fumadores activos	23.1%	20%	0.70
Estatinas	89.4%	89.1%	0.96
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	67.5 ± 17.4	67.6 ± 17.6	0.93
Lípidos plasmáticos (mg/dL)			
Colesterol Total	181±43	163±38	<0.001
Colesterol-LDL	99±34	89±31	0.035
Colesterol-HDL	46±12	46±15	0.84
Triglicéridos	147±74	156±731	0.84

*Según la clasificación de la Sociedad Cardiovascular Canadiense (Canadian Cardiovascular Society, CCS). eGFR = índice de filtrado glomerular estimado.

ES 2 344 396 B1

TABLA 2

Características angiográficas de los pacientes con o sin reestenosis tras implantación de stent coronario

	Sin reestenosis (n= 168)	Con reestenosis (n= 116)	P
Extensión de enfermedad coronaria			
1 vaso	29.9%	27.2%	0.79
2 vasos	42.1%	41.2%	
3 vasos	28%	31.6%	
Características del vaso objetivo			
LAD	45%	44%	0.21
LCx	26%	26.3%	
RCA	29.5%	29%	
Principal izquierda	0.5%	0.7%	
Zona de lesión			
Ostial	8%	5%	0.73
Proximal	40%	46%	
Media	46%	44.5%	
Distal	6%	4.5%	
Tipo de lesión			
A	12%	13%	0.48
B1	24%	22%	
B2	36%	36%	
C	28%	29%	
Diámetro de estenosis, %			
Basal	86 ± 10	86 ± 12	0.57
Post-intervención	1 ± 3	1 ± 3	0.39
Seguimiento	25 ± 3.5	38 ± 3.5	<0.001
Diámetro de vaso referencia, mm			
Basal	3.20 ± 0.58	3.20 ± 0.51	0.79
Post-intervención	3.34 ± 0.558	3.32 ± 0.58	0.82
Seguimiento	3.31 ± 0.47	3.24 ± 0.46	0.08
Diámetro luminal mínimo, mm			
Basal	0.48 ± 0.37	0.45 ± 0.37	0.35
Post-intervención	3.32 ± 0.56	3.31 ± 0.54	0.80
Seguimiento	3.01 ± 0.70	0.88 ± 0.95	<0.001
Ganancia aguda, mm	2.91 ± 0.55	2.93 ± 0.61	0.74
Pérdida tardía, mm	0.67 ± 0.07	0.97 ± 0.14	<0.001
Índice de pérdida	0.13 ± 0.23	0.88 ± 0.34	<0.001
Longitud de lesión, mm	18.6 ± 9.8	17.3 ± 9.0	0.26

LAD=arteria izquierda descendente anterior; LCx=arteria izquierda circunfleja; RCA=arteria coronaria derecha.

En el presente estudio se analizaron 47 SNPS localizados en 8 genes humanos reguladores del ciclo celular, incluyendo activadores de proliferación (ciclinas A1, E1, B1, y D1) (Ver figura 1) y supresores de crecimiento celular (p21, p27, p57, y p53) (Ver figura 2).

En la figura 1 se muestran los 25 SNPs analizados para los genes activadores de ciclo celular y la proteína que codifican entre paréntesis: CCNA1 (Ciclina A1), CCNE1 (Ciclina E1), CCNB1 (Ciclina B1) y CCND1 (Ciclina D1). La columna "Polimorfismo" incluye la posición y los alelos asociados a dichos polimorfismos. La posición del polimorfismo se muestra respecto al inicio de transcripción del gen, identificado como la base nucleotídica +1. Se especifica con un número negativo el polimorfismo que se encuentra antes del inicio de transcripción y con un número positivo cuando se localiza en una posición posterior. En la columna "Localización" se representa la situación del polimorfismo respecto a la estructura funcional del gen. Más detalladamente, la localización "Región promotora", especifica que el polimorfismo se encuentra localizado en la región reguladora de la transcripción del gen localizada antes del inicio de transcripción (+1). La localización "Exón" especifica que el polimorfismo se encuentra localizado en la región codificante del gen. La localización "Intrón" especifica que el polimorfismo se encuentra localizado en una región intrónica no codificante del gen. Las localizaciones UTR 3' y UTR 5' especifican que el polimorfismo se encuentra localizado en una secuencia no traducida en la región 3' o 5', respectivamente.

ES 2 344 396 B1

En la figura 2 se muestran los 22 SNPs analizados para los genes inhibidores de ciclo celular y la proteína que codifican entre paréntesis: CDKN1A (p21 Kip1/Cip1), CDKN1B (p27 Kip1/Cip1), CDKN1C (p57 Kip1/Cip1) y TP53 (p53).

5 El genotipado de los 47 SNPs (descrito más adelante) se realizó en muestras de ADN purificado a partir de leucocitos circulantes de 284 pacientes sometidos a revascularización mediante implantación de *stent*, de los cuales 168 no se vieron afectados de reestenosis y 116 sufrieron esta enfermedad (definiéndose como reestenosis una reducción del diámetro interno de la luz del vaso superior al 50% con respecto a la luz del segmento inmediatamente adyacente a la zona intervenida, tras evaluación angiográfica efectuada en el periodo de 6 a 9 meses tras la intervención). El análisis estadístico para identificar aquellos polimorfismos que pueden aumentar el riesgo de desarrollar reestenosis se realizó mediante regresión logística utilizando el programa SNPStat (*Sole, Guiño, Valls, Iniesta and Moreno, "SNPStats: a web tool for the analysis of association studies", Bioinformatics 2006, 22, 1928-9*). Del total de 47 SNPs analizados, sólo se observó asociación estadísticamente significativa con mayor riesgo de reestenosis para los SNPs 1-4, rs164390, rs350099, rs350104, rs875459, en el gen CCNB1; SNP5, rs2282411, en el gen CCNA1 y SNP6, rs733590, en el CDKN1A.

La figura 3 resume los 6 SNPs que mostraron asociación estadísticamente significativa con el riesgo a sufrir reestenosis tras implantación de *stent*.

20 En la figura 4 se muestran los resultados del análisis de regresión logística utilizando el programa SNPStat (*Sole, Guiño, Valls, Iniesta and Moreno, "SNPStats: a web tool for the analysis of association studies", Bioinformatics 2006, 22, 1928-9*) de los SNPs asociados con riesgo de reestenosis tras la implantación de un *stent* y corregidos por edad y sexo.

25 Los resultados mostraron que, respecto a SNP1, los individuos portadores del alelo T en homocigosis (T/T) presentaban un aumento significativo de 1.74 veces la probabilidad de sufrir reestenosis respecto a los individuos portadores del alelo C en homocigosis (C/C) o heterocigosis (C/T) (Ver figura 4).

30 Respecto a SNP2, los individuos portadores del alelo C en homocigosis (C/C) presentaron un riesgo de sufrir reestenosis aumentado 1.77 veces respecto a los individuos portadores del alelo T en homocigosis (T/T) o heterocigosis (T/C) (Ver figura 4).

35 Respecto a SNP3, los individuos portadores del alelo G en homocigosis (G/G) presentaban un riesgo de sufrir reestenosis aumentado 1.81 veces respecto a los individuos portadores del alelo T en homocigosis (T/T) o heterocigosis (G/T) (Ver figura 4).

40 En relación con SNP4, los individuos portadores del alelo G en homocigosis (G/G) presentaron un riesgo de sufrir reestenosis aumentado 1.78 veces respecto a los individuos portadores del alelo T en homocigosis (T/T) o heterocigosis (G/T). El análisis de regresión logística aplicado al SNP4 tuvo en cuenta los factores reestenosis, sexo, edad y antecedentes familiares de los pacientes analizados (Ver figura 4).

45 Respecto a SNP5, en un modelo de codominancia, la presencia del alelo T en homocigosis (T/T) o en heterocigosis (C/T) respecto al alelo C en homocigosis (C/C) tienen 1.26 y 3.10 veces mayor riesgo de sufrir reestenosis, respectivamente. En un modelo de dominancia, la presencia del alelo G en homocigosis (G/G) se asocia con un aumento del riesgo de sufrir reestenosis de 1.78 veces con respecto al alelo T en homocigosis (T/T) o heterocigosis (G/T). El análisis de regresión logística aplicado al SNP5 tuvo en cuenta los factores reestenosis, sexo, edad y tipo de *stent* implantado en los pacientes analizados (Ver figura 4).

50 En relación con SNP6, en un modelo de codominancia, la presencia del alelo T en homocigosis (T/T) aumentó el riesgo de sufrir reestenosis 1.92 respecto al alelo C en heterocigosis (C/T) y 2.38 veces respecto al alelo C en homocigosis (C/C). En un modelo de dominancia, la presencia del alelo T en homocigosis (T/T) aumentó el riesgo de sufrir reestenosis 2.08 veces respecto al alelo C en heterocigosis (T/C) u homocigosis (C/C) (Ver figura 4).

55 *Análisis de los genes*

Para la detección de los polimorfismos y el genotipado de las muestras se empleó el software *LightCycler 480 Scanning* y el kit *LightCycler 480 High Resolution Melting Master*.

60 La mezcla del kit contenía el fluoróforo *LightCycler 480 ResoLight*, que se une de forma homogénea a la doble cadena de ADN y gracias a sus características químicas puede ser utilizado en altas concentraciones sin inhibir la reacción de amplificación.

65 Durante los ciclos de la reacción de PCR se monitorizó la formación de los fragmentos amplificados. Las muestras con variaciones en su secuencia se distinguieron por discrepancias en las curvas de fusión. Al utilizar esta técnica fue posible diferenciar entre muestras homocigotas y heterocigotas e incluso entre homocigotas salvajes y mutantes.

ES 2 344 396 B1

Diseño de cebadores

El diseño de cada pareja de cebadores, empleados en la reacción de PCR por gen, se realizó con el programa *Primer 3* (Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Ver tabla 3).

En el diseño de los cebadores (Ver tabla 3), la temperatura de fusión se indicó alrededor de 62°C y el tamaño de los amplicones entre 100-250 pbs.

TABLA 3

Cebadores diseñados para los polimorfismos estudiados

Gen	SNP	GeneBank	Cebadores
<u>CCNB1</u>	SNP1	rs350099	Sentido AATAACGATCCAAAGAAACCAAATG (SEQ ID NO 7) Antisentido CCCATAGAGCAACGGTATAAGAGC (SEQ ID NO 8)
<u>CCNB1</u>	SNP2	rs350104	Sentido CCCCCTTGCTAATGTGTGA (SEQ ID NO 9) Antisentido GACATTCTTTCATTTGATCGTTGC (SEQ ID NO 10)
<u>CCNB1</u>	SNP3	rs164390	Sentido CCAAAGTGCTGGGATTACAGG (SEQ ID NO 11) Antisentido CAATTATTCATATGGTCAACCACAAAC (SEQ ID NO 12)
<u>CCNB1</u>	SNP4	rs875459	Sentido GAGGCTAGGCTGGCTCTTCTC (SEQ ID NO 13) Antisentido CATGGCTTCCTCTTCACCAG (SEQ ID NO 14)
<u>CCNA1</u>	SNP5	rs2282411	Sentido GTATGCCGCGTGATTTCTAGG (SEQ ID NO 15) Antisentido CTGTGGGAAGAAAAGG (SEQ ID NO 16)
<u>CDKN1A</u>	SNP6	rs733590	Sentido CTGGGCAGAGATTTCCAGACTC (SEQ ID NO 17) Antisentido AAAATTGCAGAGGATGGATTGTTC (SEQ ID NO 18)

Reacción de amplificación

Para la reacción de amplificación se utilizó el kit *High Resolution the LightCycler® 480 Master* de Roche Applied Science. La mezcla se encontraba a 2X y contenía ADN polimerasa FastStart Taq y el fluoróforo *LightCycler 480 ResoLight* en el tampón de reacción sin MgCl₂. Esta mezcla es compatible con la adición DMSO para mejorar la amplificación de secuencias ricas en GC.

La ADN polimerasa FastStart Taq es una enzima termoestable, modificada químicamente, que no muestra actividad a temperaturas de hasta 75°C. La enzima se activa sólo a altas temperaturas, donde los cebadores no se pueden unir de forma inespecífica a la secuencia.

a. Reactivos y Volúmenes

En la tabla 4 se enumeran los reactivos empleados en cada reacción de amplificación, las concentraciones iniciales y finales y los volúmenes necesarios.

ES 2 344 396 B1

TABLA 4

Reactivos y volúmenes

Reactivo	[Conc. inicial]	[Conc. final]	Volumen (µL)
Master Mix,	2X	1X	5
Cebadores	4 µM	0.2 µM	0.5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	1.2
Agua	-	-	2.3
ADN	20 ng/µL	2 ng/µL	1
Volumen total			10

b. *Condiciones de la Reacción*

Para optimizar la amplificación de los diferentes fragmentos, se determinaron los mejores parámetros de ciclos térmicos.

La tabla 5 muestra las condiciones para la reacción de amplificación tras la optimización de diferentes parámetros.

TABLA 5

Condiciones de la reacción de amplificación

Setup					
Detection Format	HRM Dye				
Programs					
Program Name	Cycles		Analysis Mode		
Pre-Denaturation	1		None		
Amplification	45		Quantification		
High Resolution Melting	1		Melting Curves		
Cooling	1		None		
Temperature Targets					
Target [°C]	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s) (96-well / 384-well)	Acquisitions (per °C)	
Pre-Incubation					
95	None	00:10:00	4.8	-	
Amplification					
95	None	00:00:10	4.8	-	
62	None	00:00:10	2.5	-	
72	Single	00:00:10 – 00:00:20 ³⁾	4.8		
High Resolution Melting					
95	None	00:01:00	4.8		
40	None	00:01:00	2.5		
60	None	00:00:01	1	-	
95	Continuous	-	-	25	
Cooling					
40	None	00:00:10	4.8	-	

ES 2 344 396 B1

El tiempo estimado del ensayo fue de 75 min para la PCR y 15 min para la curva de desnaturalización (*High Resolution Melting*). La reacción se puede hacer en un termociclador convencional y luego leerse en un sistema *LightCycler 480*.

5 En el caso concreto de los polimorfismos SNP1, SNP3 y SNP4, tras la reacción de la amplificación, se añadió a cada pocillo un microlitro de una muestra estándar con genotipo homocigoto salvaje para cada polimorfismo y se procedió al paso de desnaturalización. De este modo se logró distinguir claramente entre los dos homocigotos.

10 *Análisis de los resultados*

Se utilizó el Software *LightCycler® 480 Gene Scanning* para determinar las estructuras heterodúplex en las muestras mediante el análisis de los datos experimentales generados utilizando el sistema *LightCycler® 480 High Resolution Melting*.

15 Después de que las muestras fueran amplificadas por PCR y desnaturalizadas para obtener las curvas de fusión, el software analizó las formas de las curvas individuales y agrupó las muestras con una curva de fusión similar.

20 En las figuras 12 y 13 se observan las curvas de fusión de SNP1 y SNP2, respectivamente. Los dos fragmentos del gen CCNB1 que contenían ambos polimorfismos fueron amplificados en diferentes muestras de ADN genómico humano usando el kit “*LightCycler 480 High Resolution Melting Master*” y analizado por el software “*LightCycler 480 Scanning*”. Este software detecta diferencias en las curvas de fusión, resultado de las diferencias entre variaciones en la secuencia de los productos de PCR y agrupando las muestras en función de cada genotipo. En ambas figuras se distingue claramente cada genotipo, especialmente las variantes homocigotas (rojo y verde). En los paneles (a) 25 se puede ver la representación de las curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura) mientras que en los paneles (b) se representa la diferencia entre curvas normales y alteradas por la presencia del polimorfismo (en función de la temperatura).

30 En las figuras 14, 15, 16 y 17 se muestran las curvas de fusión normalizadas, utilizando la misma metodología descrita en el párrafo anterior, para el resto de los polimorfismos estudiados: los polimorfismos SNP3 (figura 14) y SNP4 (figura 15) del gen CCNB1, el polimorfismo SNP5 del gen CCNA1 (figura 16) y el SNP6 del gen CDKN1A (figura 17).

35 *Estudios funcionales asociados a los polimorfismos SNP1 y SNP2*

Debido a la localización de los polimorfismos rs350099 (SNP1) y rs350104 (SNP2) en el promotor del gen CCNB1 humano, se estudió la posibilidad de que los alelos que mostraban una asociación estadísticamente significativa, con un mayor riesgo de reestenosis tras implantación de *stent*, podrían favorecer la unión de factores transcripcionales 40 activadores y/o represores que pudieran modificar la actividad transcripcional del gen.

El estudio de las secuencias mediante el uso de la base de datos *Transfac® 7.0* predijo la existencia de sitios de unión NF-Y y AP-1 para las secuencias nucleotídicas que contenían los alelos T y C de los polimorfismos SNP1 y SNP2 respectivamente. El estudio de la actividad de unión a ADN de los factores transcripcionales NF-Y y AP-1 a las 45 variantes alélicas correspondientes se llevó a cabo mediante la técnica de EMSA.

Así, el análisis de la secuencia con el alelo T del SNP1 predijo la existencia de la secuencia CCAAT, sitio de unión específico para el factor de transcripción NF-Y. Sin embargo el mismo tipo de análisis para el alelo C del SNP1 no predijo tal sitio de unión.

50 De acuerdo con estas predicciones, los datos obtenidos en el estudio confirmaron la unión eficiente y específica del factor NF-Y a la secuencia asociada a la presencia del alelo T respecto al alelo C en el SNP1 (Ver figuras 7-9).

Por otra parte, el análisis de la secuencia con el alelo C del SNP2 predijo la existencia de un sitio de unión AP-1. Sin embargo el mismo tipo de análisis para el alelo T del SNP2 no predijo tal sitio de unión. Los datos obtenidos en 55 el estudio confirmaron una mayor actividad AP-1 de unión a ADN cuando está presente en la secuencia el alelo C del SNP2 en posición -475 respecto a la secuencia que contiene el alelo T correspondiente al mismo polimorfismo (Ver figura 10).

60 *Ensayo de Movilidad Electroforética Retardada (“Electroforetic Mobility Shift-Assay”, EMSA)*

El mareaje radiactivo de la sonda se realizó incubando 1 pmol de los oligonucleótidos de doble cadena, a 65°C durante 10 min en un volumen final de 10 μ L para desestabilizar las posibles estructuras secundarias. Seguidamente 65 se enfrió rápidamente en hielo y se añadió 1 μ L T4-polinucleótido quinasa y 1 μ L de [γ ³²P]-dATP (10 mCi/mL) incubando la reacción de mareaje a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo en hielo, se purificó la sonda en una columna de Sephadex G-50 y se llevó a un volumen final de 100 μ L.

ES 2 344 396 B1

En la figura 6 se muestra la relación detallada de los oligonucleótidos de doble cadena utilizados como sondas para los ensayos de EMSA. En la columna de "Secuencia", se muestran las secuencias de las dos cadenas complementarias de cada sonda. La descripción detallada de la secuencia contenida en la sonda se muestra en la columna "Descripción". Las secuencias predichas y consenso de unión a NF-Y y AP-1 se encuentran remarcadas en negrita y los alelos de los SNPs se muestran contenidos en las cajas blancas.

Las proteínas de la fracción nuclear soluble de extractos nucleares de células humanas (3 μg) se preincubaron durante 10 min en hielo en volumen final de 17 μL de Tampón de EMSA (Tris-HCl pH: 7.8 20 mM, 5% glicerol, MgCl_2 3 mM, KCl 60 mM, EDTA 0.5 mM, DTT 0.1 mM, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de poli(d(I-C))). A continuación se añadió 1 μL de sonda de oligonucleótido de doble cadena marcada radiactivamente y se incubó durante 30 min en hielo. Finalmente se añadió a cada tubo 1 μL de tampón de carga y las muestras se separaron mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 5%. La separación se llevó a cabo durante aproximadamente 2 horas a 200 mV en tampón TBE 0.5x (preparado a partir de un stock 5X) en un gel al 5% de poliacrilamida (80:1, archilamida: bisacrilamida) preparado en tampón TBE 0.5X. Los geles se secaron al vacío con una temperatura de 80°C durante 2 horas y se analizaron por autorradiografía (Ver figuras 7-10). Para los ensayos de competición se añadió un exceso de oligonucleótidos de doble cadena no marcados radiactivamente durante la fase de preincubación, antes de la adición de la sonda marcada radiactivamente. Para los ensayos de *supershift* (*super retardo*), previamente a la incubación con la sonda marcada, se realizó, durante 30 min, una incubación en hielo de 2 μg de anticuerpo específico (anti-NF-YB *Santacruz Biotechnology, referencia sc-13045x*) o no específico (*anti-CREB-II*, Santa Cruz Biotechnology, referencia sc-180x) con extracto nuclear.

La figura 7 muestra la identificación de actividad NF-Y asociada a la sonda SNP1-T (variante polimórfica con el alelo T del SNP1) pero no en la sonda SNP1-C (variante polimórfica con el alelo C del SNP1), en células HeLa mediante un ensayo de EMSA. El ensayo fue realizado mediante la incubación de 10 fmoles de las sondas, NF-Ycons, SNP1-T y SNP1-C marcadas radiactivamente y extractos de la fracción nuclear soluble de células HeLa (3 μg , 12 μg y 12 μg de proteína, respectivamente). Las muestras fueron corridas en gel de poliacrilamida y los complejos DNA-proteína fueron determinados por autorradiografía. Los controles de la reacción de unión se incubaron en ausencia de extracto nuclear (Carriles 1, 5 y 9). Los ensayos de *supershift* se realizaron con la preincubación durante 30 minutos con los anticuerpos anti-NF-YB y anti-CREB-II (este último utilizado como control de especificidad).

La figura 8 muestra como un exceso de sonda SNP1-T, pero no de SNP1-C compite la actividad de unión a ADN asociada a la secuencia NF-Y de la sonda NF-Ycons. El ensayo de competición se realizó mediante la técnica de EMSA realizado mediante la incubación de 10 fmoles de la sonda NF-Ycons marcada radiactivamente con 3 μg de extracto proteico de la fracción nuclear soluble de células HeLa y un exceso de las sondas no marcadas radiactivamente (sonda "fría"). Las sondas no marcadas radiactivamente utilizadas en los ensayos de competición son (el exceso se muestra entre paréntesis): NF-Ycons (Carril. 3: 100x), NF-Ymut (Carril. 4: 100x), SNP1-T (Carril. 5: 100x; Carril. 6: 300x; Carril. 7: 900x), y SNP1-T (Carril. 8: 100x; Carril. 9: 300x; Carril. 10: 900x). Las muestras fueron corridas en gel de poliacrilamida y los complejos ADN-proteína fueron visualizados por autorradiografía.

La figura 9 muestra como un exceso de sonda SNP1-T, pero no de SNP1-C compite la actividad de unión a ADN asociada a la secuencia NF-Y de la región -30/-10 del promotor del gen humano *CCNB1*. Más detalladamente, se muestra el análisis de la actividad de la secuencia de unión a NF-Y de la región -27/-17 del promotor de *CCNB1* (sonda NF-Y (-30/-10) competido con un exceso de las sondas "frías" SNP1-T y SNP1-C. El estudio de competición fue llevado cabo mediante la técnica de EMSA incubando 10 fmoles de la sonda NF-Y (-30/-10) marcada radiactivamente, 8 μg de extracto proteico de la fracción nuclear soluble de células HeLa y un exceso de las sondas "frías" NF-Y (-30/-10) (Carril 3: 20x; Carril 4: 60x), SNP1-T (Carril 5: 20x; Carril 6: 60x), y SNP1-C (Carril 7: 20x; Carril 8: 60x). Las muestras fueron corridas en gel de poliacrilamida y los complejos ADN-proteína fueron visualizados por autorradiografía.

La figura 10 muestra como un exceso de sonda SNP2-C (variante polimórfica con el alelo C del SNP2) compite de forma más eficaz la actividad de unión a ADN asociada a la sonda AP-1 consenso (AP-1cons), respecto a la sonda SNP2-T (variante polimórfica con el alelo T del SNP2). El ensayo fue llevado a cabo mediante la técnica de EMSA incubando extracto nuclear soluble de células derivadas de osteosarcoma humano ("Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells", U2OS) y la sonda AP-1cons marcada radiactivamente. Los experimentos de competición se realizaron incubando un exceso de 25 veces la sonda AP-1 (Carril 3), 25 a 200 veces la sonda SNP2-C (Carriles 4-7) y 25 a 200 veces la sonda SNP2-T (Carriles 8-11), no marcadas radiactivamente. La figura muestra un EMSA representativo de un total de cinco. La intensidad de banda relativa de los complejos ADN-proteína en cada EMSA analizado independientemente se cuantificó mediante un análisis de imagen computerizado ("*Metamorph software*") y los valores se representan en la gráfica como $\text{media} \pm \text{SEM}$. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante ANOVA de un factor y un test de comparación múltiple de Bonferroni. Las comparaciones respecto al control (sin competidor) se representan como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Empleo de un polimorfismo seleccionado de entre SNP1, SNP2, SNP3, SNP4 y sus combinaciones, del gen CCNB1, tal y como se definen en la figura 3, como marcador del riesgo de un individuo de sufrir reestenosis tras la implantación de un *stent*.
- 10 2. Método para la determinación del riesgo de un individuo de sufrir reestenosis tras la implantación de un *stent* que comprende: a) obtener el ADN de una muestra del individuo; b) analizar dicha muestra para determinar el genotipo de al menos un polimorfismo de base única (SNP) seleccionado entre SNP1, SNP2, SNP3 y SNP4, en el gen CCNB1, tal y como se definen en la figura 3, donde la presencia del genotipo TT de SNP1, del genotipo CC de SNP2, del genotipo GG de SNP3 y del genotipo GG de SNP4, es indicativa del riesgo de sufrir reestenosis.
- 15 3. Método, según la reivindicación 2, donde el paso b) comprende determinar el genotipo de los polimorfismos SNP1 y SNP2.
- 20 4. Método, según la reivindicación 2, donde la muestra de ADN se obtiene de saliva, sangre o leucocitos purificados a partir de sangre.
- 25 5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que comprende adicionalmente determinar el genotipo del polimorfismo SNP5, del gen CCNA1, tal y como se define en figura 3, donde la presencia del genotipo TT o TC, en un modelo de codominancia, o del genotipo GG, en un modelo de dominancia, es indicativa del riesgo de sufrir reestenosis.
- 30 6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, que comprende adicionalmente determinar el genotipo del polimorfismo SNP6, del gen CDKN1A, tal y como se define en la figura 3, donde la presencia del genotipo TT, es indicativa del riesgo de sufrir reestenosis.
- 35 7. Kit para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 2-6 que comprende un set de oligonucleótidos y reactivos adecuados para la determinación del genotipo de al menos un SNP del gen CCNB1, seleccionado entre SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, y sus combinaciones.
- 40 8. Kit, según la reivindicación 7, donde la determinación del genotipo de SNP1 se lleva a cabo mediante el par de oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 7 y 8.
- 45 9. Kit, según la reivindicación 7, donde la determinación del genotipo de SNP2 se lleva a cabo mediante el par de oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 9 y 10.
- 50 10. Kit, según la reivindicación 7, donde la determinación del genotipo de SNP3 se lleva a cabo mediante el par de oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 11 y 12.
- 55 11. Kit, según la reivindicación 7, donde la determinación del genotipo de SNP4 se lleva a cabo mediante el par de oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 13 y 14.
- 60 12. Kit, según la reivindicación 7, que comprende adicionalmente oligonucleótidos adecuados para la determinación del genotipo de SNP5 del gen CCNA1.
- 65 13. Kit, según la reivindicación 12, donde la determinación del genotipo de SNP5 se lleva a cabo mediante el par de oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 15 y 16.
14. Kit según la reivindicación 7, que comprende adicionalmente oligonucleótidos adecuados para la determinación del genotipo de SNP6 del gen CDKN1A.
15. Kit, según la reivindicación 14, donde la determinación del genotipo de SNP6 se lleva a cabo mediante el par de oligonucleótidos de secuencias SEQ ID NO 17 y 18.

ES 2 344 396 B1

Gen (proteína)	Polimorfismo Num acceso GeneBank	Posición	Localización
<u>CCNA1</u> (Ciclina A1)	rs3814805	-1917C→G	Región promotora
	rs3814803	-1669 C→T	Región promotora
	rs7985423	-170C→G	Región promotora
	rs7998324	+3910C→T	Región intrónica
	rs2282411	+7733(G)C→T	Región intrónica
<u>CCNE1</u> (Ciclina E1)	rs7257330	-1078A→G	Región promotora
	rs3218026	+237A→C	Región intrónica
	rs3218027	+451C→T	Región intrónica
	rs3218028	+484 -→G	Región intrónica
	rs3218068	+10443C→T	Región intrónica
	rs1406	+12211G→T	Región UTR 3'
<u>CCNB1</u> (Ciclina B1)	rs8192258	-1055-→A	Región promotora
	rs350099	-957C→T	Región promotora
	rs352626	-710C→T	Región promotora
	rs350104	-475C→T	Región promotora
	rs2069429	-160A→G	Región promotora
	rs164390	+102G→T	Región 5' no transcrita
	rs875459	+7010G→T	Región Intrónica
	rs1128761	+8334A→G	Exón
<u>CCND1</u> (Ciclina D1)	rs1944129	-1938A→G	Región promotora
	rs3212860	-766A→T	Región promotora
	rs3862792	+6983C→T	Exón
	rs603965	+7037A→G	Exón
	rs3212892	+9987A→G	Región intrónica
	rs7177	+10242A→C	Región UTR 3'

FIG. 1

ES 2 344 396 B1

Gen (proteína)	Polimorfismo Num acceso GeneBank	Posición	Localización
<u>CDKN1A</u> (p21 ^{Kip1/Cip1})	rs3829963	-2101A→C	Región promotora
	rs733590	-1284C→T	Región promotora
	rs762623	-1021A→G	Región promotora
	rs3176337	+2433A→C	Región Intrónica
	rs3176345	+4078C→G	Región Intrónica
	rs3176352	+5852C→G	Región Intrónica
	rs3176356	+6990C→T	Región Intrónica
	rs1059234	+7110C→T	Región UTR 3'
	rs3176358	+7475A→G	Región UTR 3'
<u>CDKN1B</u> (p27 ^{Kip1/Cip1})	rs3759217	-1857C→T	Región promotora
	rs34330	+386C→T	Región UTR 5'
	rs2066827	+790G→T	Exón
	rs34329	+2924C→G	Región Intrónica
<u>CDKN1C</u> (p57 ^{Kip1/Cip1})	rs3741341	+1147C→T	Exón
	rs452338	+378174G→T	Región 5' cercana al gen
	rs431222	+378378C→T	Región 5' cercana al gen
	rs928656	*A→G	-
	rs450563	*A→G	-
<u>TP53</u> (p53)	rs1042522	+7958C→G	Exón
	rs17883323	+8105A→C	Región Intrónica
	rs17551157	+7233-→C	Región Intrónica
	rs2287498	+21046A→G	Exón

FIG. 2

Gen (proteína)	Polimorfismo	Número de acceso de GenBank	Localización
<u>CCNB1</u> (Ciclina B1)	SNP1 : -957C→T	rs350099	Región promotora
	SNP2 : -475C→T	rs350104	Región promotora
	SNP3 +102G→T	rs164390	Región 5' no traducida
	SNP4 : +7010G→T	rs875459	Región intrónica
<u>CCNA1</u> (Ciclina A1)	SNP5 : +7733(G)C→T	rs2282411	Región intrónica
<u>CDKN1A</u> (p21 ^{Kip1/Cip1})	SNP6 : -1284C→T	rs733590	Región promotora

FIG. 3

Gen	Locus cromosómico	Polimorfismo	Modelo Genético	P	Razón de Odd	95% IC
<u>CCNB1</u>	5q12	SNP1: -957C→T rs350099	Dominancia TT	0.028	1.74 (TT respecto a CC+TC)	1.06-2.63
		SNP2: -475C→T rs350104	Dominancia CC	0.038	1.77 (CC respecto a TT+TC)	1.03-3.04
		SNP3: +102G→T rs164390	Dominancia TT + GT	0.016	1.81 (GG respecto a TT+GT)	1.12-2.94
		SNP4: +7010G→T rs875459	Dominancia TT + GT	0.033	1.78 (GG respecto a TT+GT)	1.04-3.03
<u>CCNA1</u>	13q12.3-q13	SNP5: +7733(G)C→T rs2282411	Codominancia CT	0.019	3.10 (CT respecto a CC)	1.37-7.00
			Codominancia CC	0.019	1.26 (TT respecto a CC)	0.31-5.03
			Dominancia GT + TT	0.019	1.78 (GG respecto a TT+GT)	1.04-3.03
<u>CDKN1A</u>	6p21.1	SNP6: -1284C→T rs733590	Codominancia CT	0.035	1.92 (TT respecto a CT) 2.38 (TT respecto a CC)	1.03-3.57 1.12-5.00
			Dominancia CC + CT	0.012	2.08 (TT respecto a CC+CT)	1.17-3.70

FIG. 4

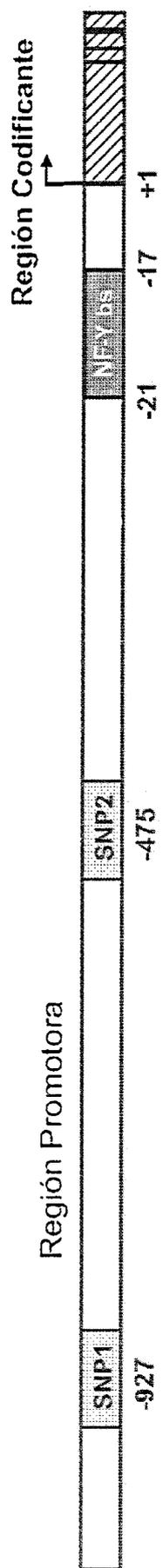


FIG. 5

Sonda	Secuencia	Descripción
SNP1-T (SEQ ID NO 19 y 20))	5' -GAGTCTCTA T TGGCTCTTATACC-3' 3' -CTCAGAGATA A CCGAGAAATATGG-5'	Secuencia portadora del alelo T del SNP rs350099
SNP1-C (SEQ ID NO 21 y 22)	5' -GAGTCTCTA C GGCTCTTATACC-3' 3' -CTCAGAGATA G CCGAGAAATATGG-5'	Secuencia portadora del alelo C del SNP rs350099
NF-Ycons (SEQ ID NO 23 y 24)	5' -CCGCAGCCGG CCA ATGGGAAGGGAGTGA-3' 3' -GGCGTCGG GGT TACCCCTTCCCTCACT-5'	Secuencia portadora de un sitio consenso de unión NF-Y
NF-Ymut (SEQ ID NO 25 y 26)	5' -CCGCAGCCGGT TAA TGGGAAGGGAGTGA-3' 3' -GGCGTCGG CAA TTACCCTTCCCTCACT-5'	Secuencia portadora de un sitio NF-Y mutado (CC→TT)
SNP2-T (SEQ ID NO 27 y 28)	5' -TAA T GTGTGA T CCCTGGCAAAG-3' 3' -ATTACACACT A GGACCCGTTTC-5'	Secuencia portadora del alelo T del SNP rs350104
SNP2-C (SEQ ID NO 29 y 30)	5' -TAA T GTGTGA C CCCTGGCAAAG-3' 3' -ATTACACACT G GGACCCGTTTC-5'	Secuencia portadora del alelo C del SNP rs350104
AP-1cons (SEQ ID NO 31 y 32)	5' -CGCTTGATG ATC AGCCGGAA-3' 3' -GCGAACTACT CAG TCGGCCTT-5'	Secuencia portadora de un sitio consenso de unión AP-1
NF-Y (-30/-10) (SEQ ID NO 33 y 34)	5' -GGCAGCCGG CCA ATGGGAAGG-3' 3' -CCGTCGG GGT TACCCCTTCC-5'	Secuencia portadora de un sitio de unión NF-Y del promotor humano del gen de la ciclina B1

FIG. 6

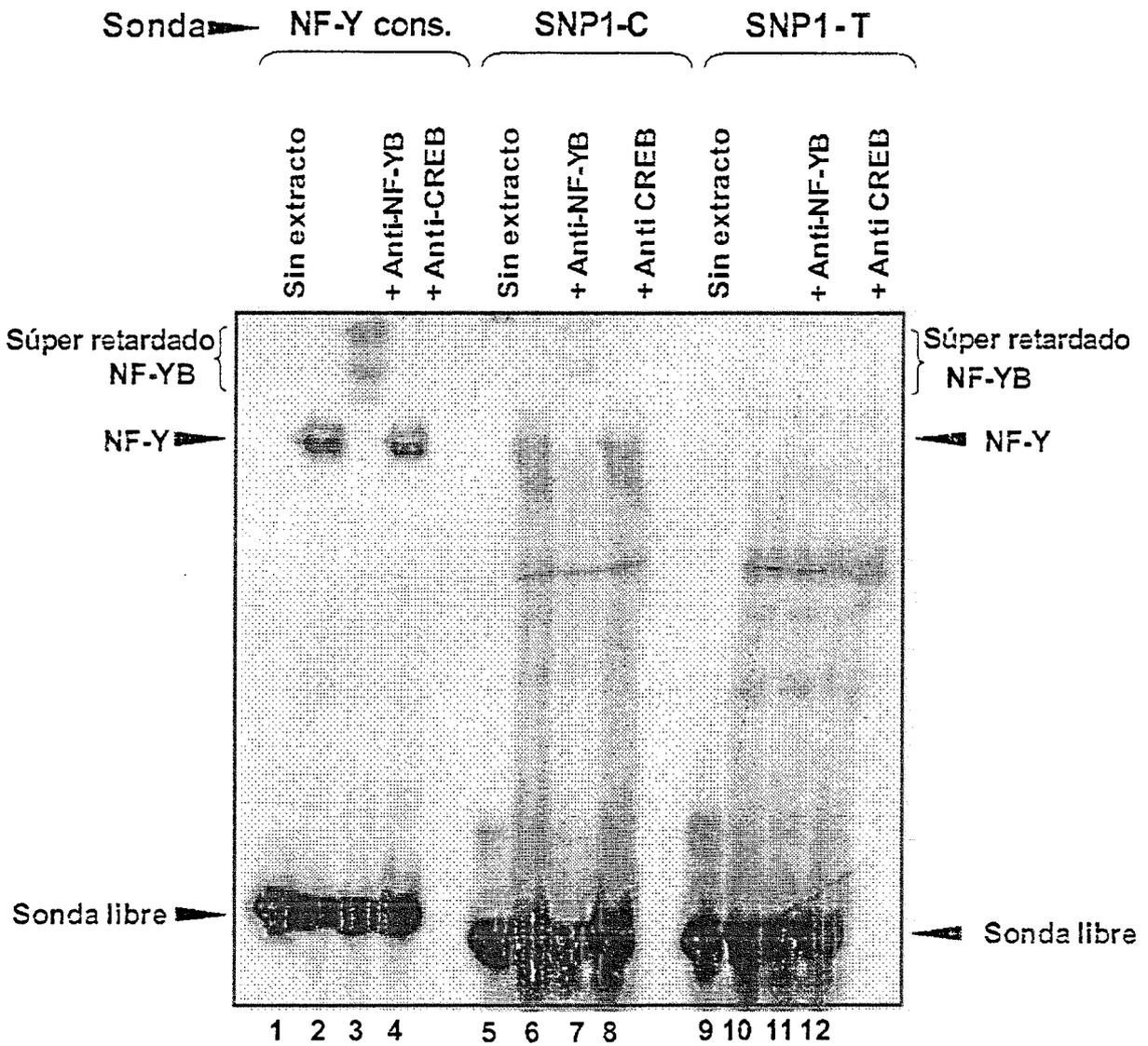


FIG. 7

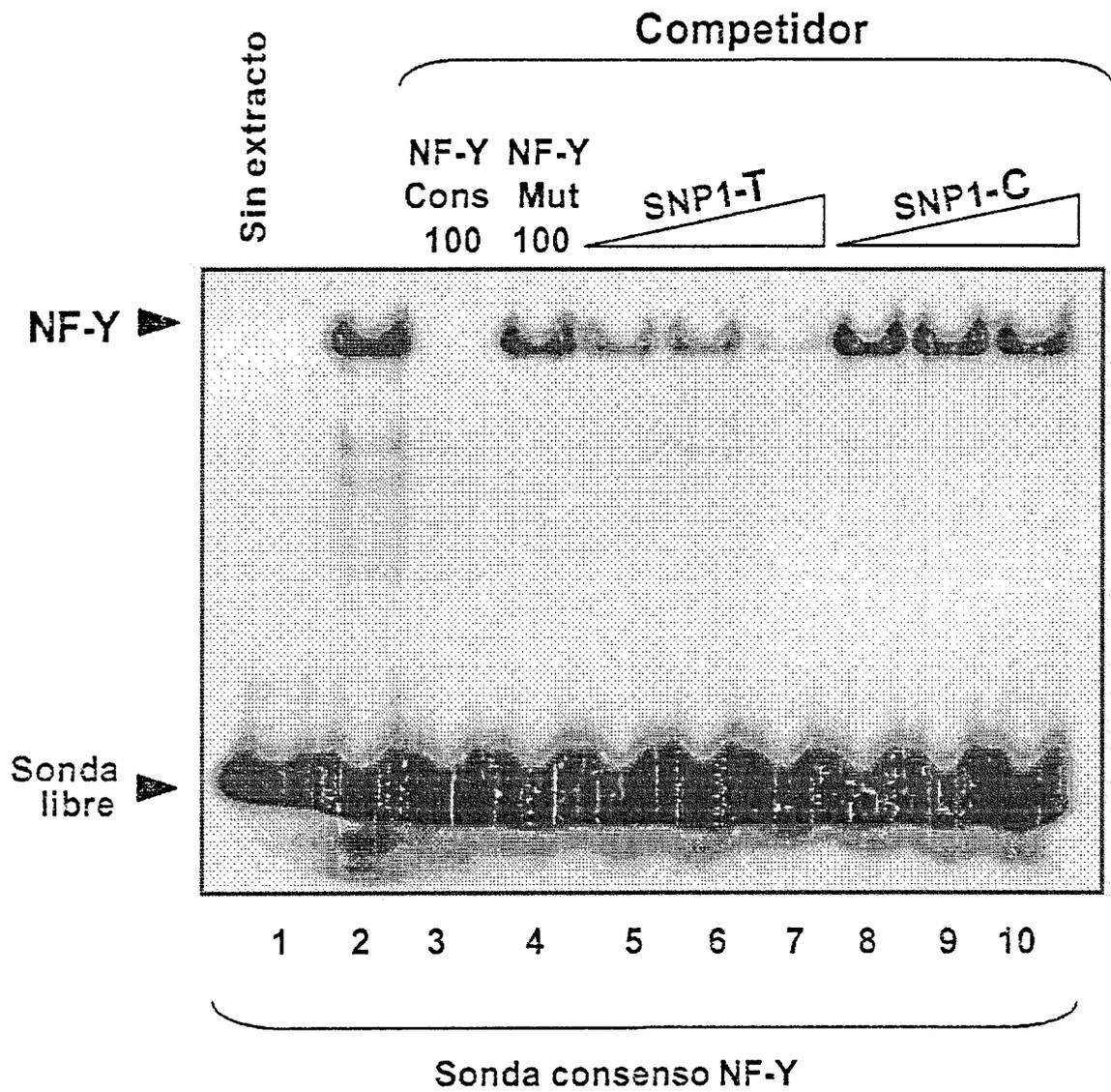


FIG. 8

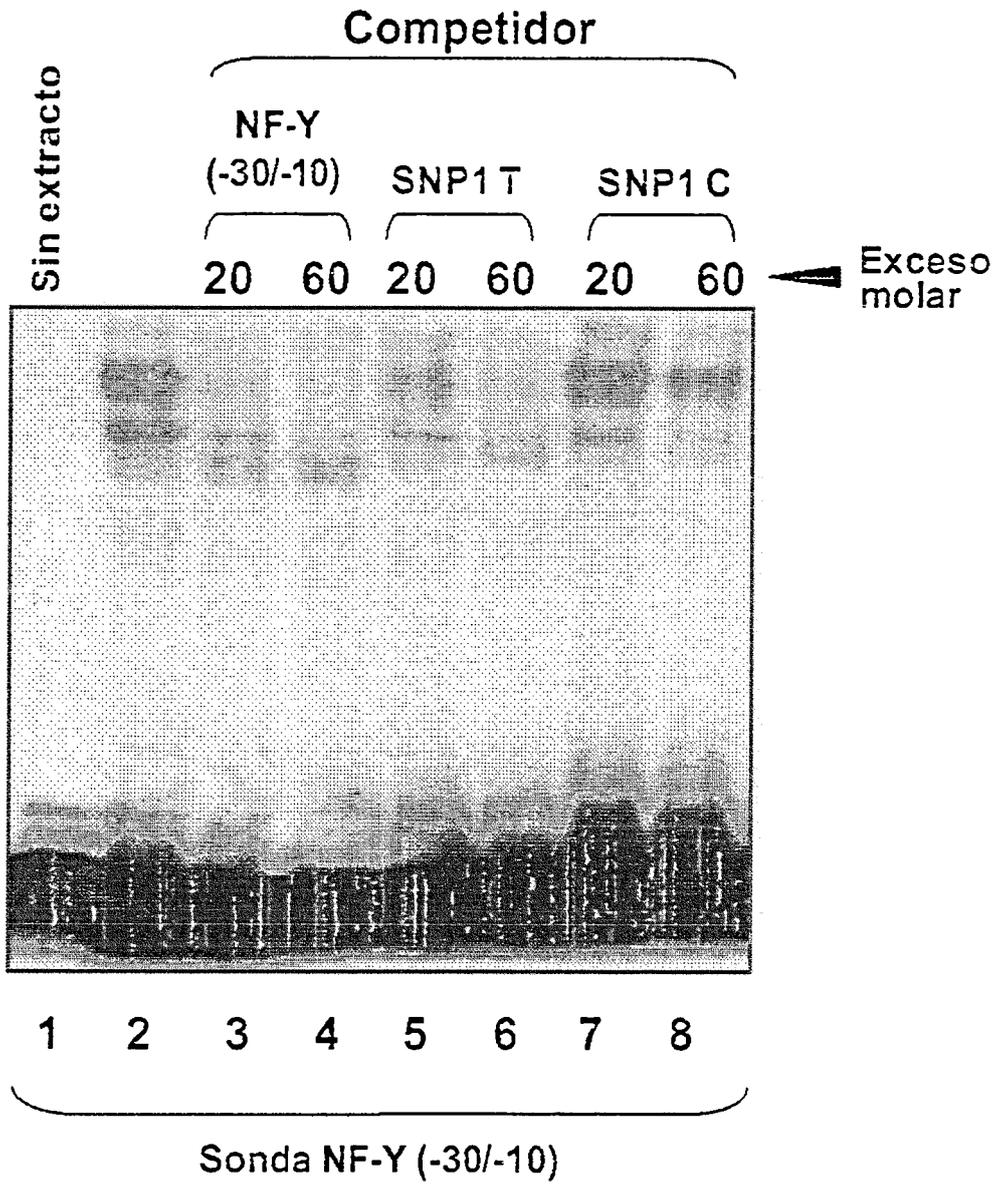


FIG. 9

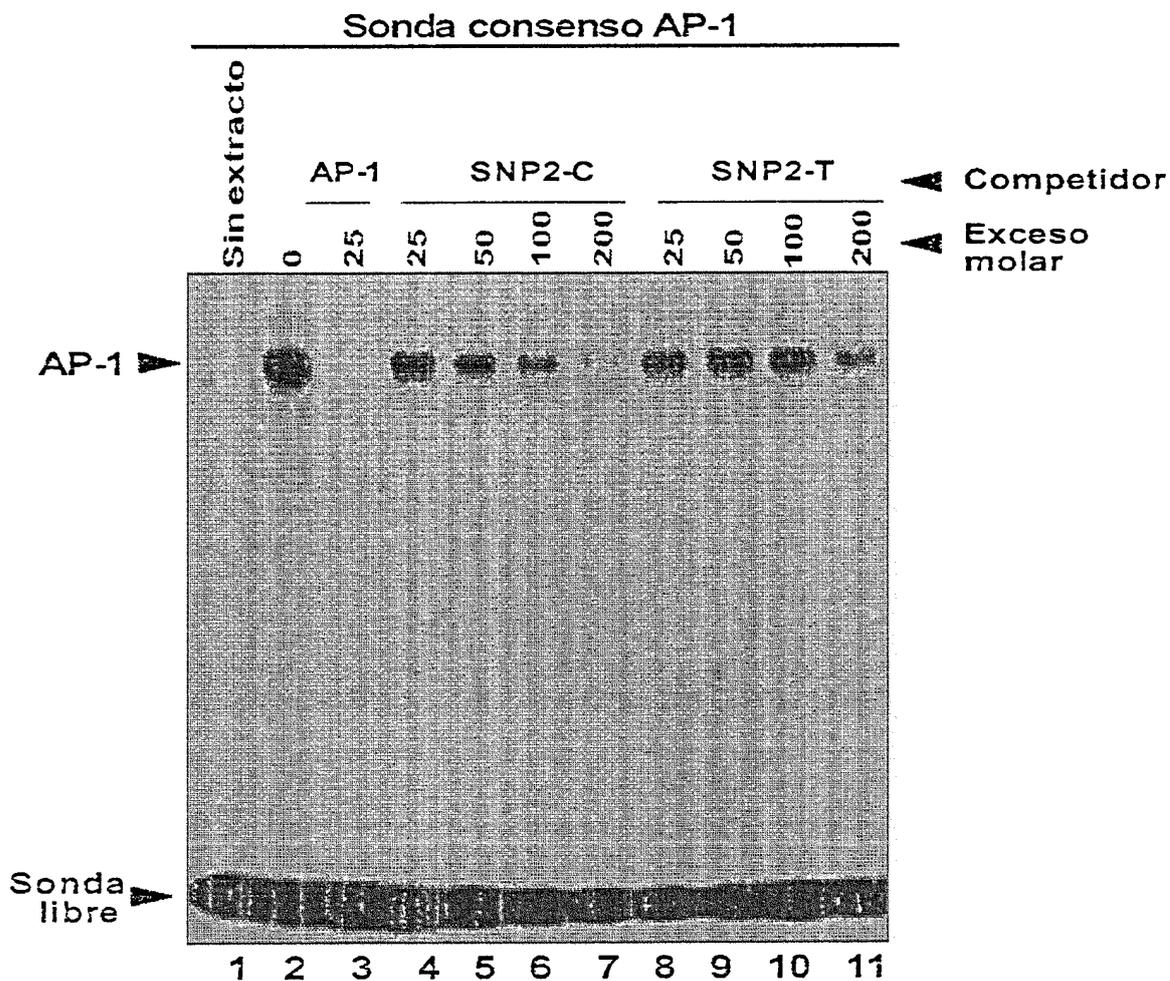


FIG. 10A

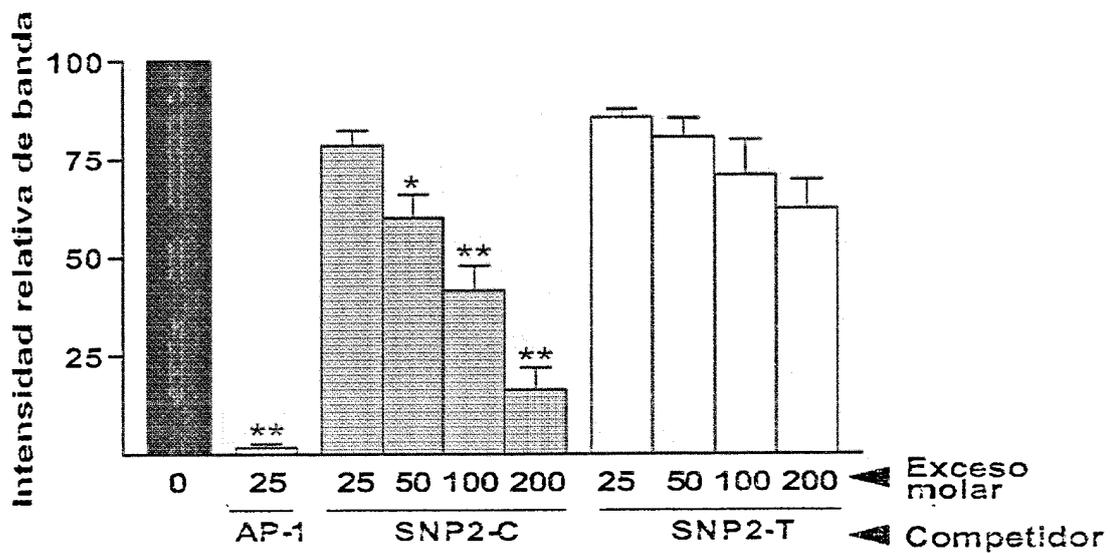


FIG. 10B

SEC NO.1

TGACTTCCAGCGCCAGGAGTCTCTAT (C/T)GGCTCTTATACCGTTGCTCTATGGG

SEC NO.2

TCAGTTCCCCCGTTGCTAATGTGTGA (C/T)CCTGGCAAAGTCATCTAAGTCGCTG

SEC NO.3

GCGGAACGGCTGTTGGTTTCTGCTGG(G/T)TGTAGGTCCTTGGCTGGTCGGGCCT

SEC NO.4

CATGTTTGCTTTATTTCTTGGTGATG (G/T)TGTTGTTTGTGGTTGACCATATGAA

SEC NO.5

GGATGATTGGGAAAGGTTGATTTTTA (C/T)GCTCCTTGGCACTGGAAGTTCCTAG

SEC NO.6

CTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTT(C/T)AGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAACA

FIG. 11

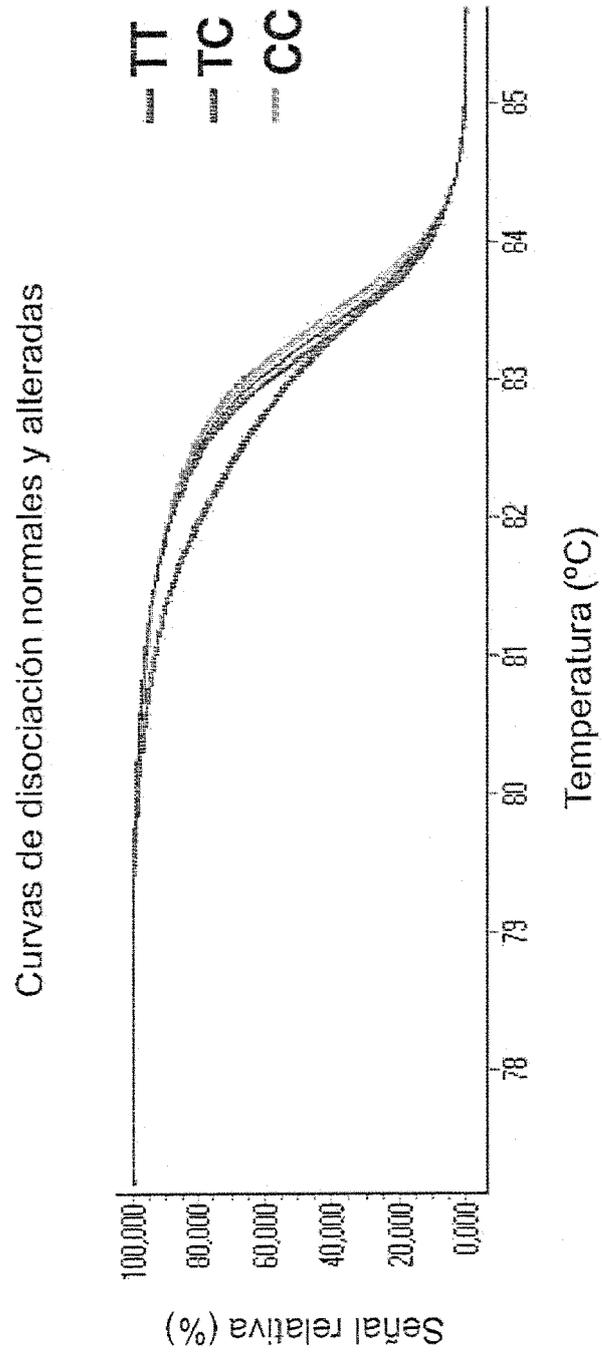


FIG. 12A

Diferencia entre curvas normales y alteradas en función de la temperatura

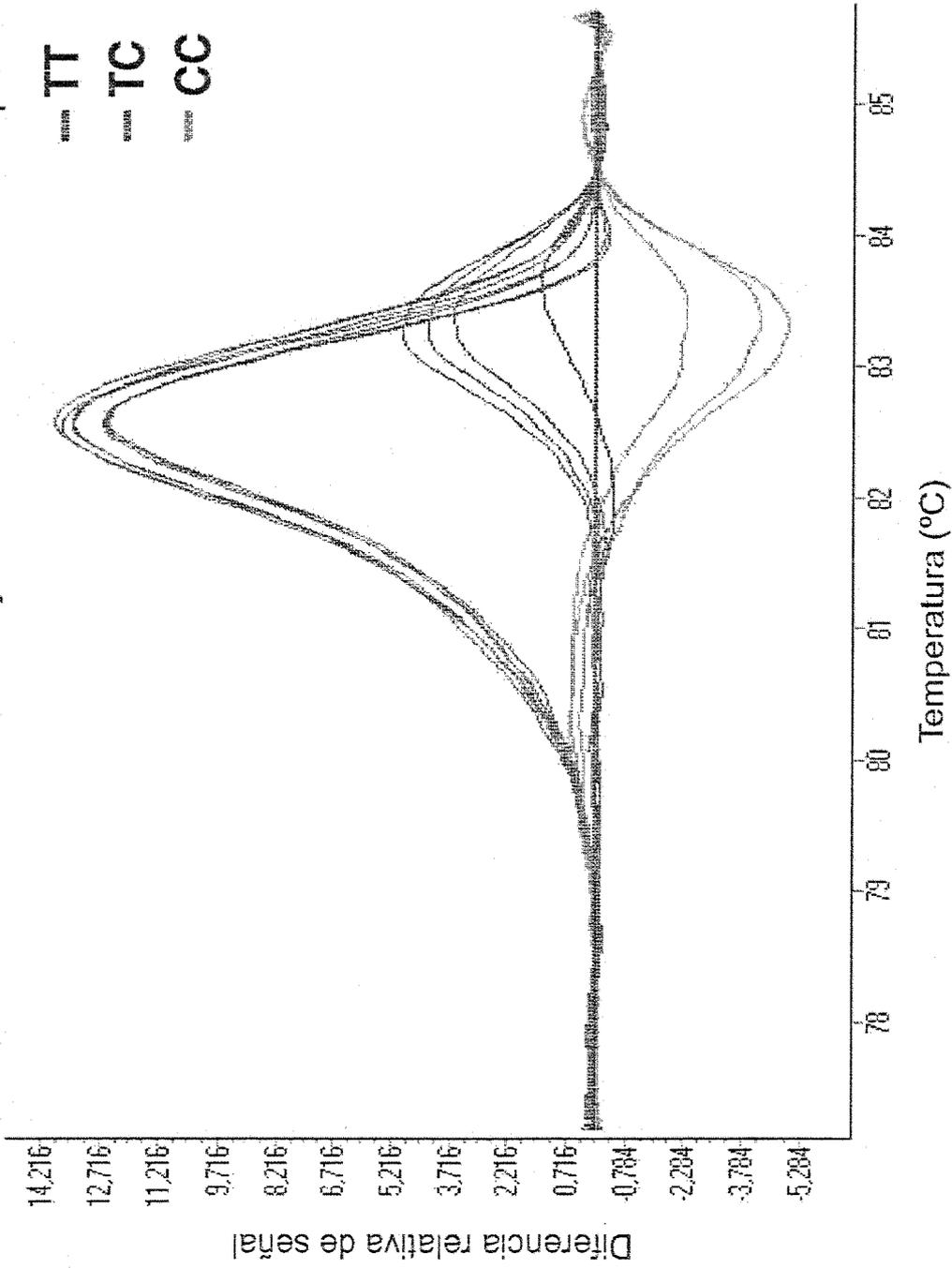


FIG. 12B

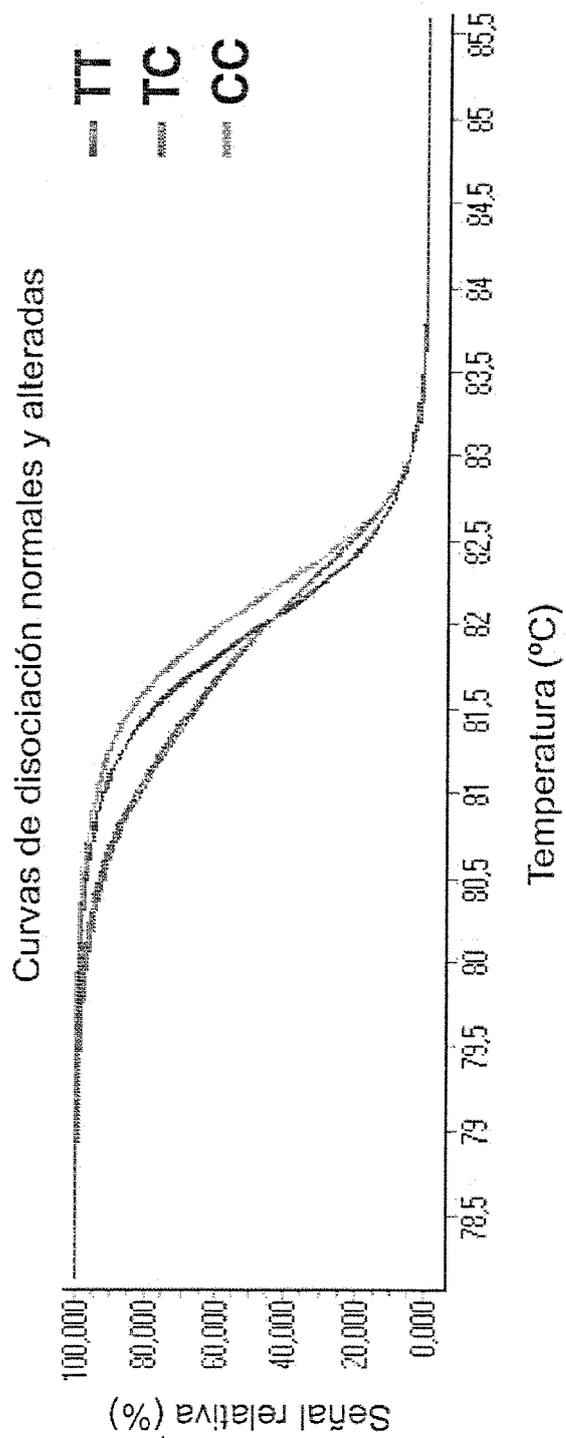


FIG. 13A

Diferencia entre curvas normales y alteradas en función de la temperatura

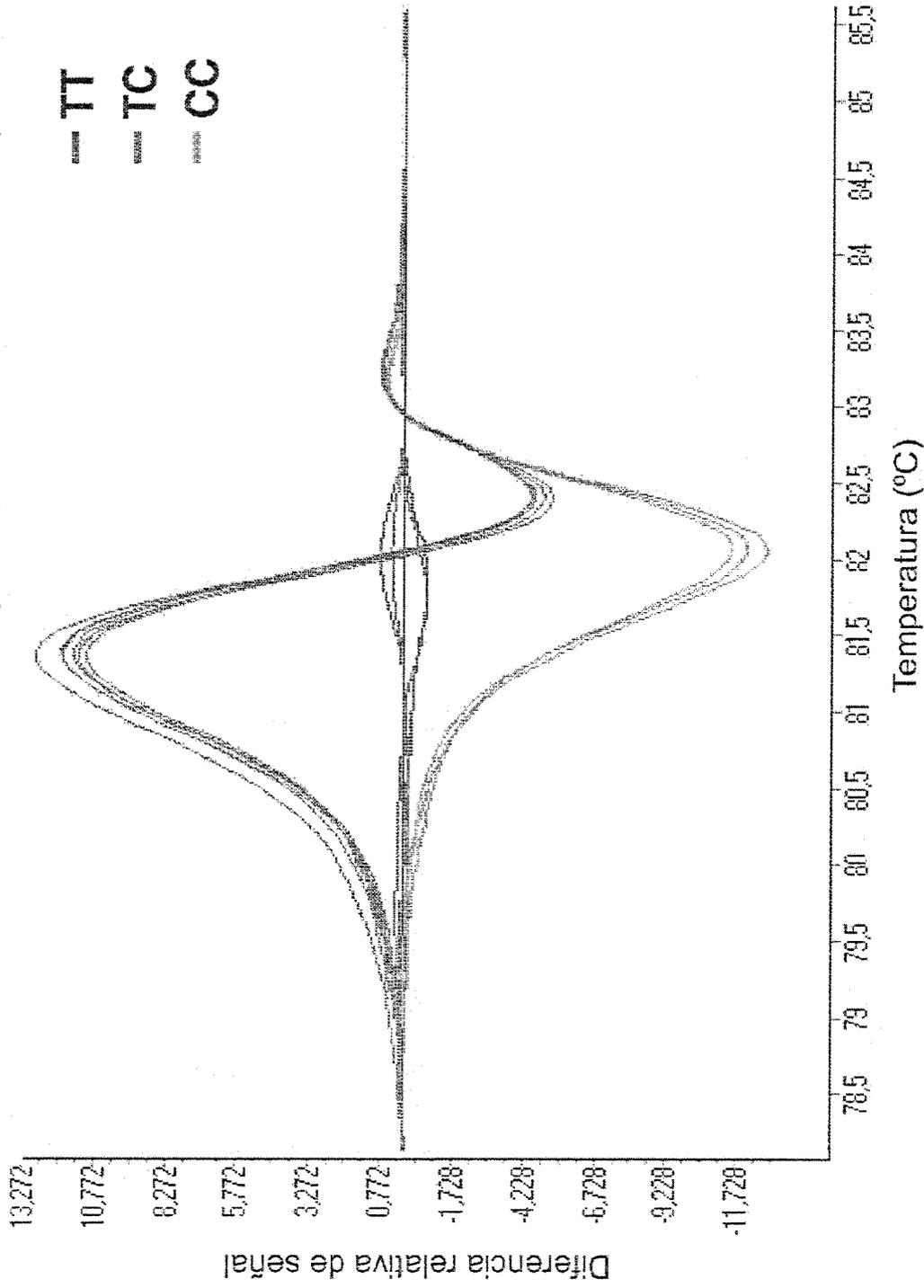


FIG. 13B

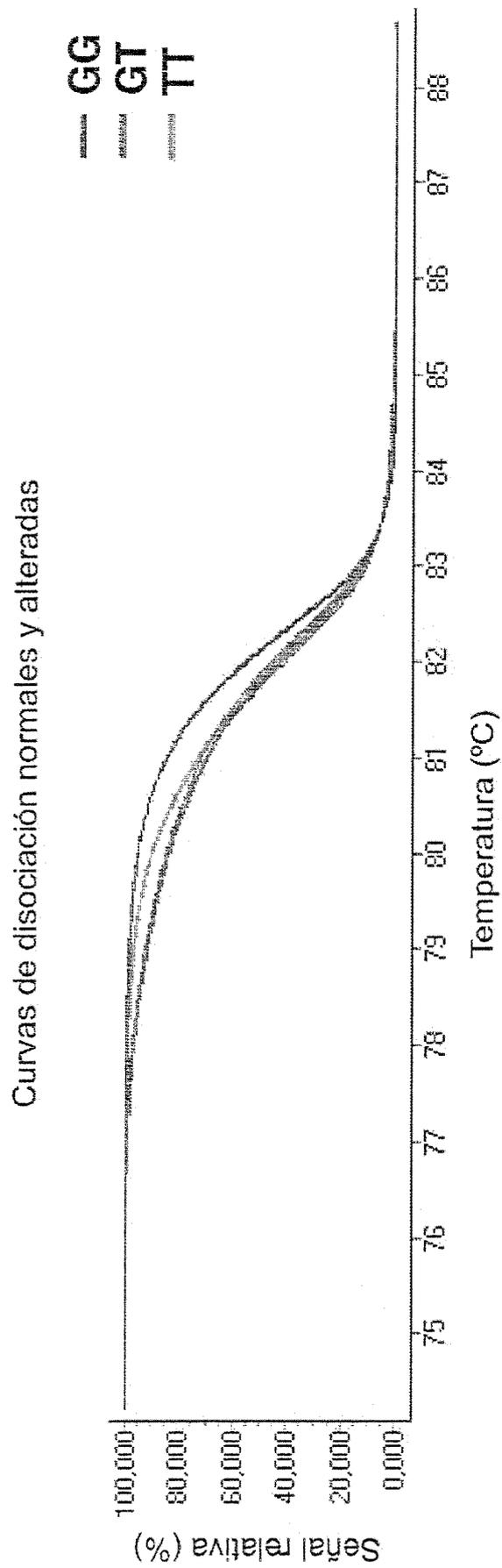


FIG. 14A

Diferencia entre curvas normales y alteradas en función de la temperatura

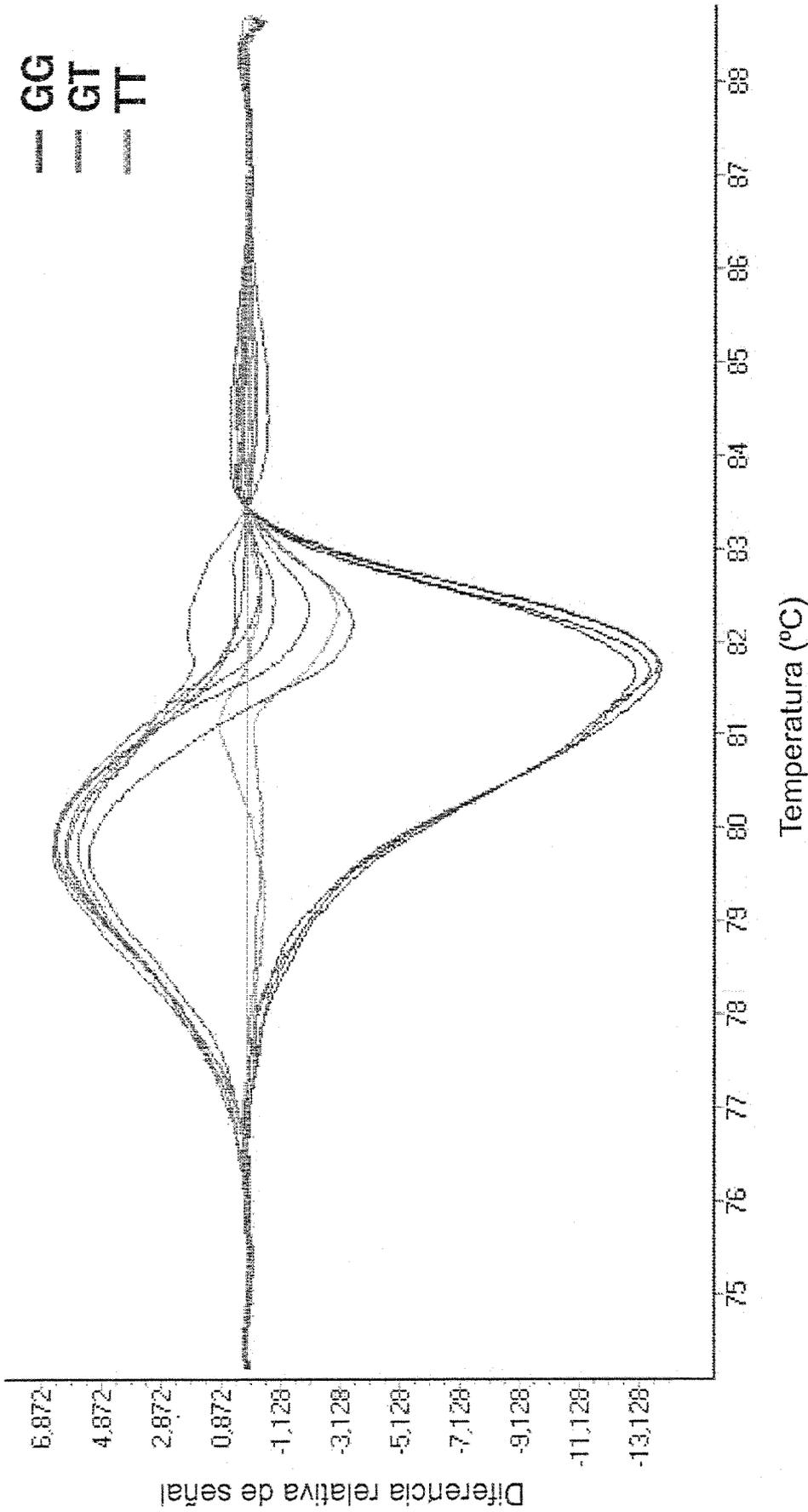


FIG. 14B

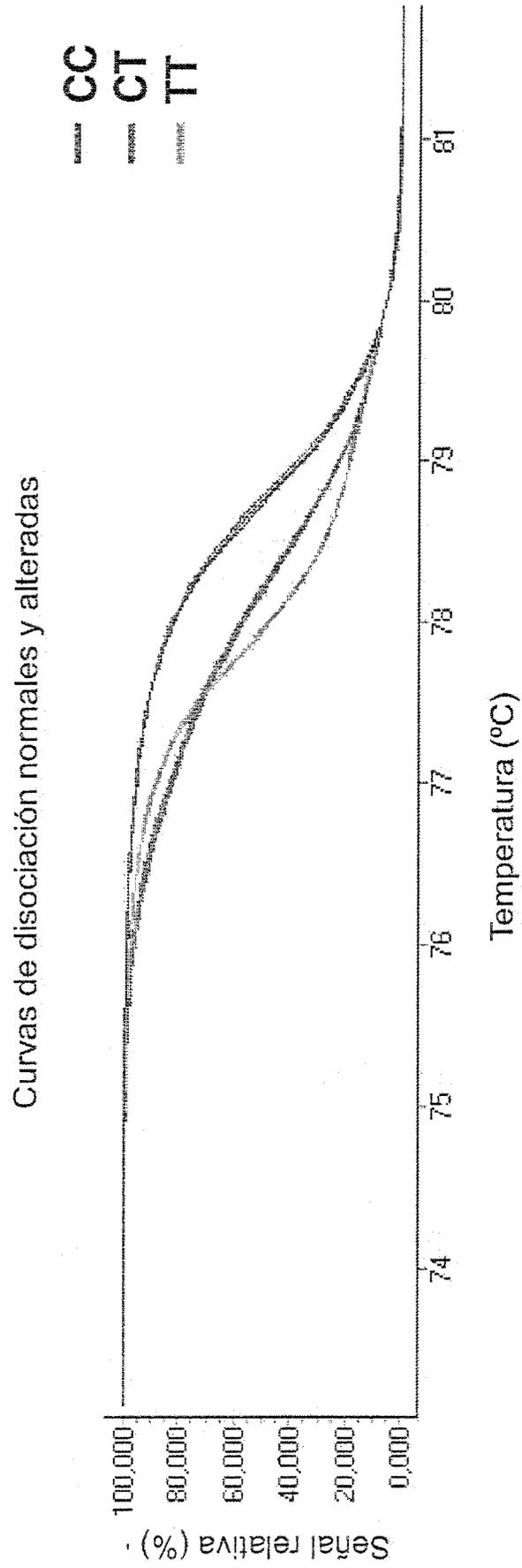


FIG. 15A

Diferencia entre curvas normales y alteradas en función de la temperatura

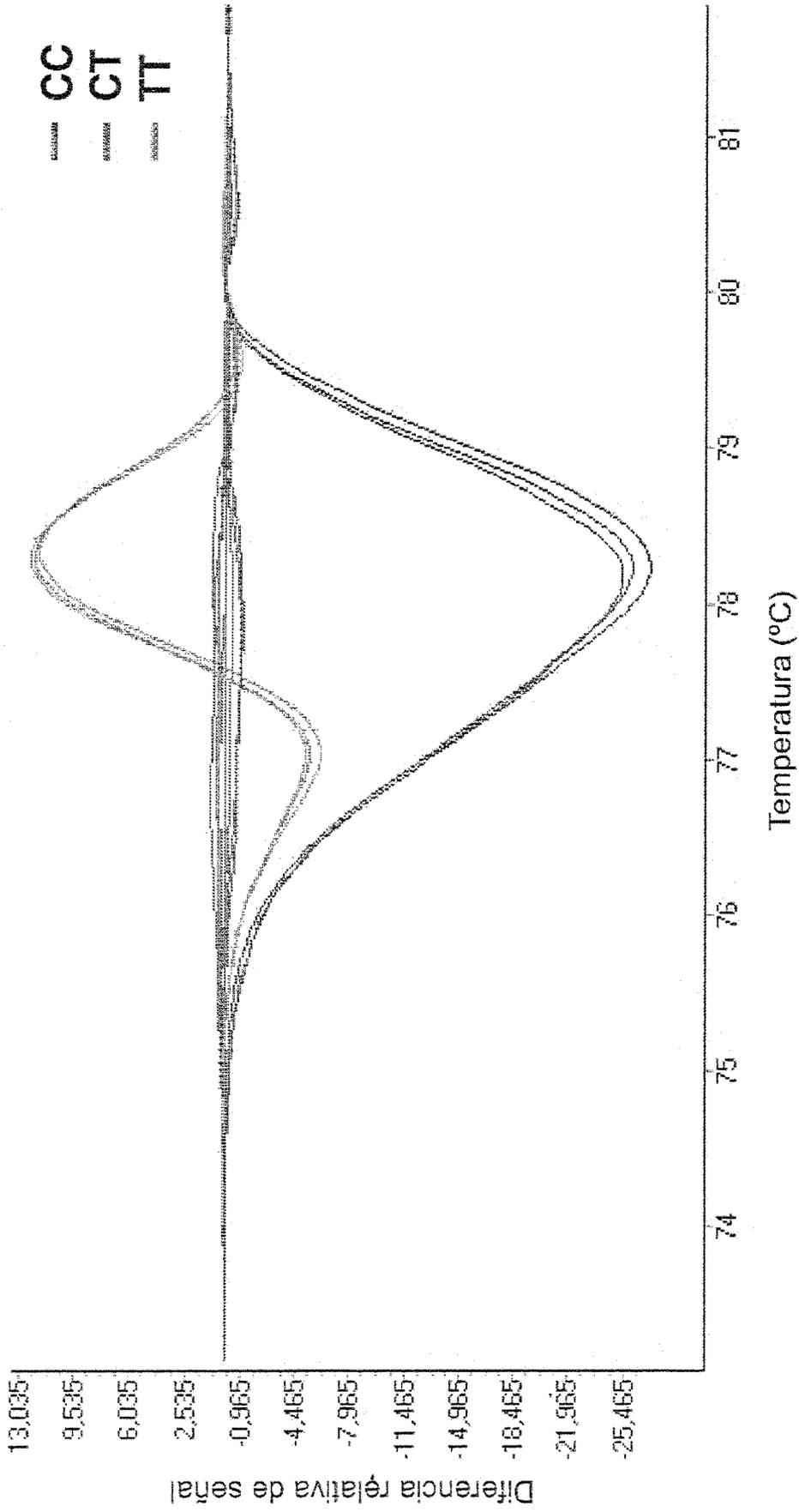


FIG. 15B

Curvas de disociación normales y alteradas

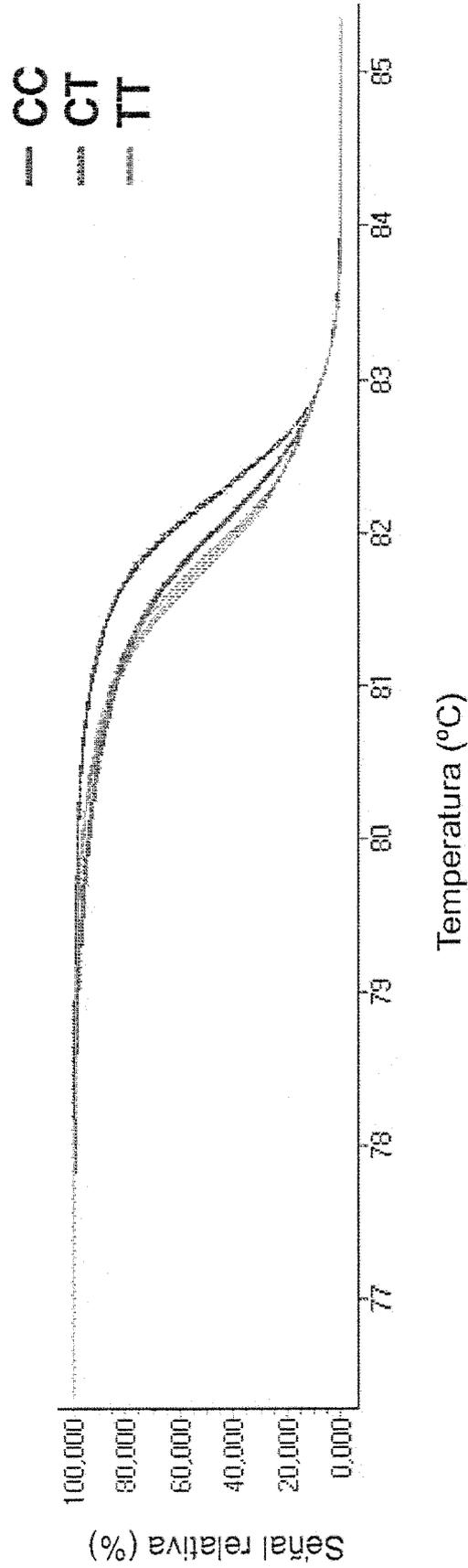


FIG. 16A

Diferencia entre curvas normales y alteradas en función de la temperatura

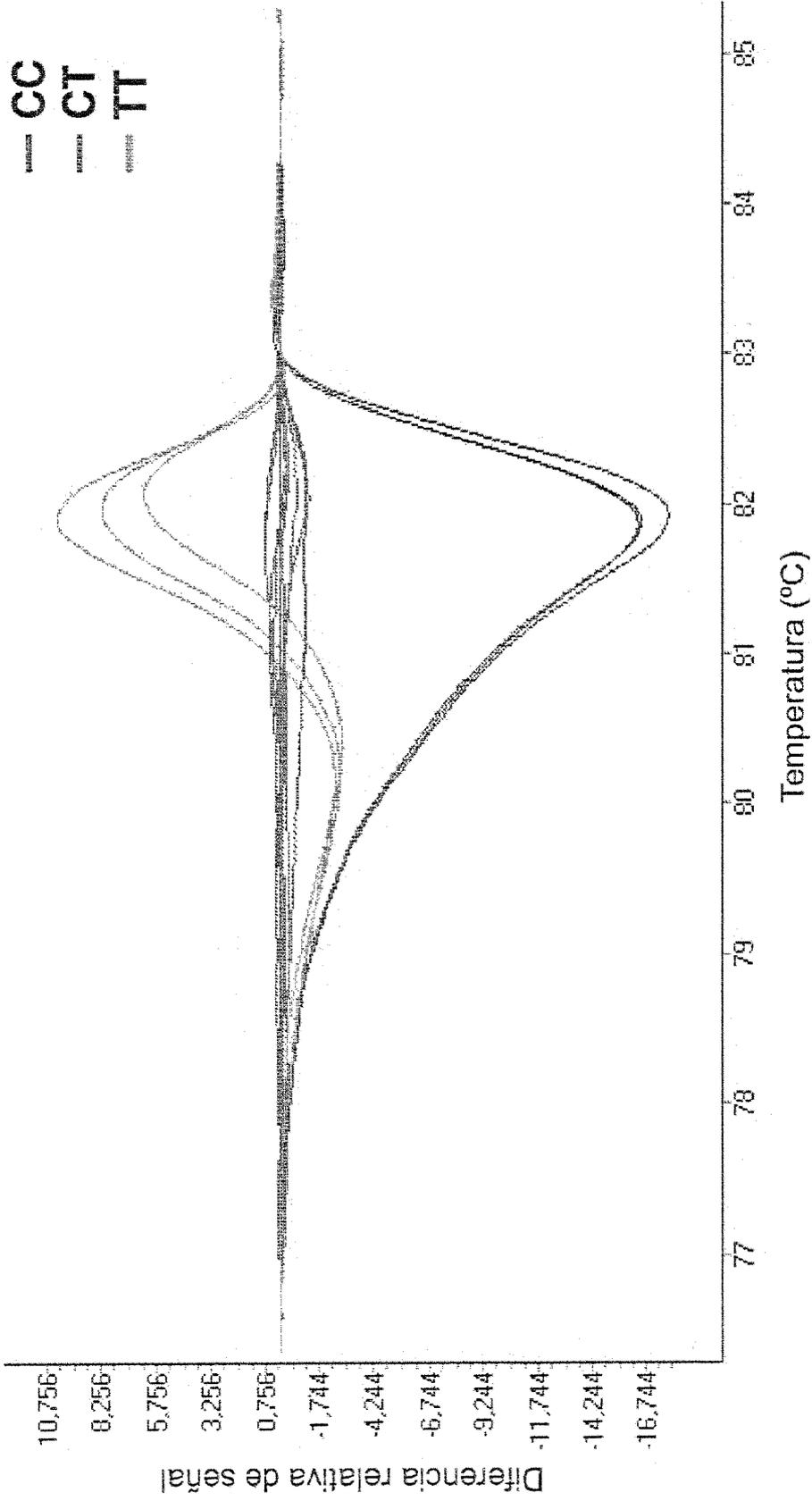


FIG. 16B

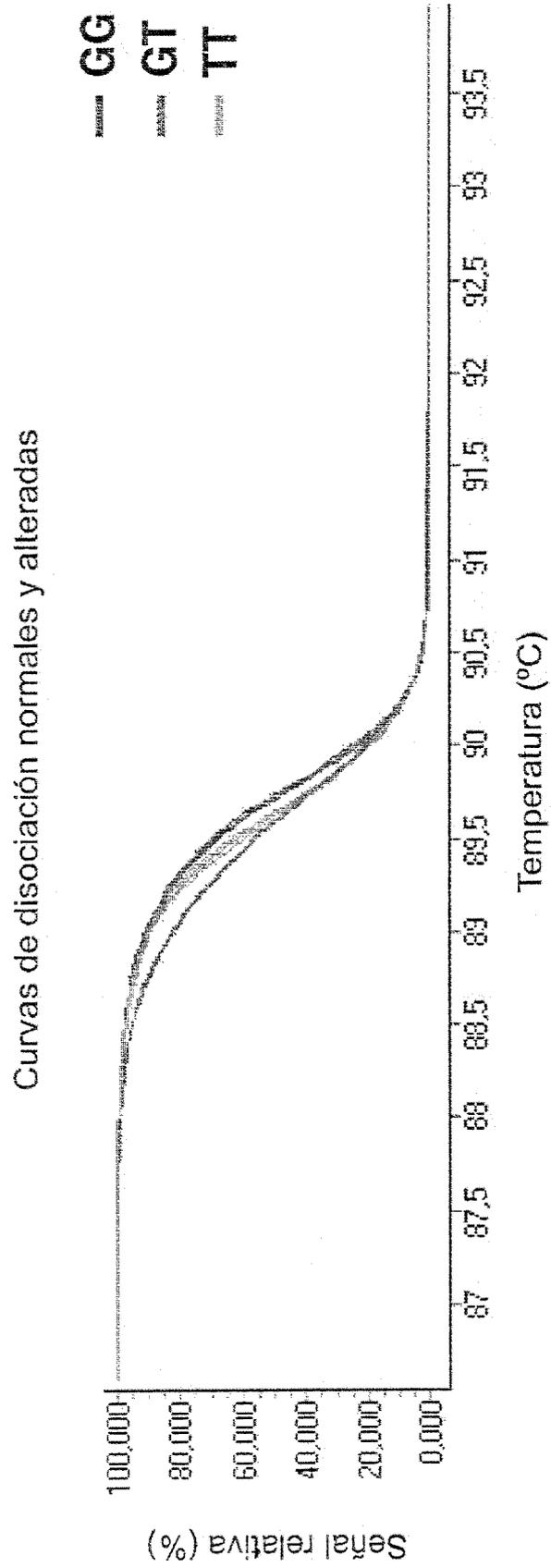


FIG. 17A

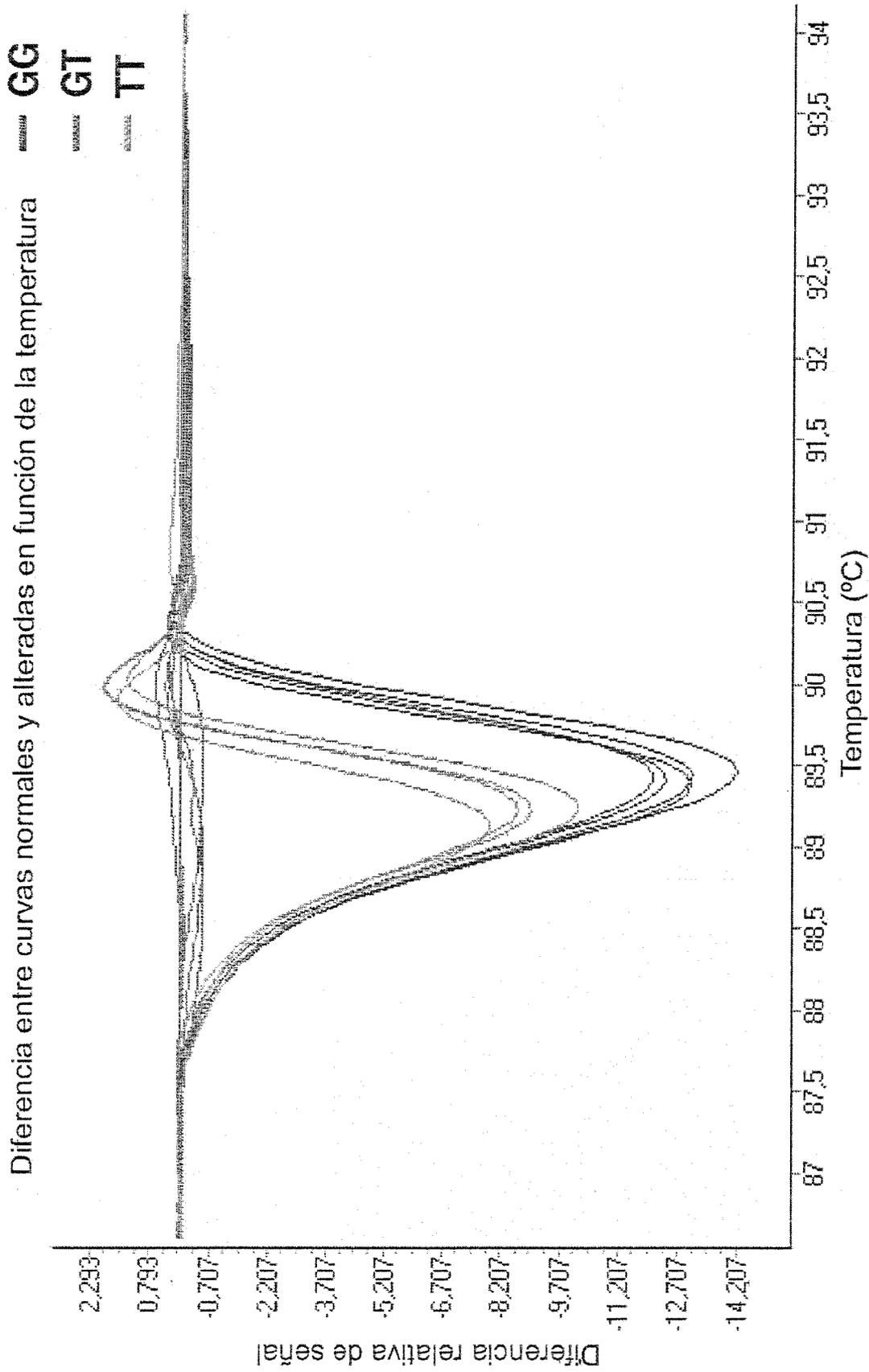


FIG. 17B



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 396

② Nº de solicitud: 200900507

③ Fecha de presentación de la solicitud: **24.02.2009**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	EP 1536001 A1 (NST. NAGOYA IND SCIENCE RES.) 01.06.2005.	1-15
Y	Rodríguez Isabel et al. "Role of the CDKN1A/p21, CDKN1C/p57, and CDKN2A/p16 genes in the risk of atherosclerosis and myocardial infarction". Cell cycle. 01.03.2007. Vol. 6, Nº. 5, páginas 620-625. ISSN 1551-4005 (Electronic)	1-15
A	Matarin Mar et al. "A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release". LANCET NEUROLOGY. 12.04.2007. Vol. 6, Nº. 5, páginas 414-420. ISSN 1474-4422.	1-5
A	Samani Nilesh J. et al. "Genomewide association analysis of coronary artery disease". The New England journal of medicine. 02.08.2007. Vol. 327, Nº 5, páginas 443-453. ISSN 1533-4406 (Electronic).	1-15
A	Cha et al. "Association of CCR2 polymorphisms with the number of closed coronary artery vessels in coronary artery disease". CLINICA CHIMICA ACTA. 24.05.2007. Vol. 382, Nº. 1-2, páginas 129-133. ISSN 0009-8981.	1-15
A	WO 2005083127 A2 (APPLERA CORP.) 09.09.2005	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.06.2010

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, GENECARDS, EBI-SITE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1536001 A1	01-06-2005
D02	Rodríguez Isabel et al. "Role of the CDKN1A/p21, CDKN1C/p57, and CDKN2A/p16 genes in the risk of atherosclerosis and myocardial infarction". Cell cycle . 01.03.2007. Vol. 6, Nº 5, páginas 620-625. ISSN 1551-4005 (Electronic)	01-03-2007
D03	Matarin Mar et al. "A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release". LANCET NEUROLOGY. 12.04.2007. Vol. 6, Nº5, páginas 414-420. ISSN 1474-4422.	12-04-2007
D04	Samani Nilesh J. et al. "Genomewide association analysis of coronary artery disease". The New England journal of medicine. 02.08.2007. Vol. 327, Nº 5, páginas 443-453. ISSN 1533-4406 (Electronic).	02-08-2007
D05	Cha et al. "Association of CCR2 polymorphisms with the number of closed coronary artery vessels in coronary artery disease". CLINICA CHIMICA ACTA. 24.05.2007. Vol. 382, Nº. 1-2, páginas 129-133. ISSN 0009-8981.	24-05-2007
D06	WO 2005083127 A2	09-09-2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga la provisión de marcadores genéticos tipo SNP para la determinación del riesgo que tiene un individuo de sufrir restenosis después de una angioplastia coronaria.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan un método de detección de los SNPs 1-6 como marcadores de riesgo de restenosis, por lo que el empleo de los SNPs 1-6 (SNPs de la tabla 3, página 23, y páginas 21-22) para la determinación del riesgo a sufrir restenosis sería nuevo. Igualmente los cebadores diseñados y que forman parte de los Kits reivindicados, SEQ.ID.Nºs 7-18, cumplirían con el requisito de novedad.

El documento D01 representa el estado de la técnica mas cercano al objeto de la invención. Divulga un método para determinar el riesgo de sufrir restenosis posterior a una angioplastia coronaria que comprende la determinación de 2 o más polimorfismos de entre 6 divulgados. Esos polimorfismos se encuentran en los genes divulgados en la reivindicación 1, los cuales tienen una relación directa con la enfermedad.

La diferencia entre D01 y la presente solicitud sería los genes seleccionados que contienen SNPs cuya presencia se correlacione de manera estadísticamente significativa con la presencia de restenosis en un grupo de pacientes seleccionados.

El efecto técnico producto de esa diferencia sería la provisión de genes adicionales a los ya conocidos que tuviesen relación con esta patología.

La solución que presenta la solicitud es la selección de los genes reguladores del ciclo celular CCNB1, CCNA1, CDKN1A.

Sin embargo, la elección de genes relacionados con el ciclo celular no puede considerarse como inventiva. D02 divulga un método de identificación de SNPs en genes reguladores del ciclo celular, cuya manipulación modifica el riesgo de desarrollar aterosclerosis en ratones. En concreto, el estudio divulga un método de detección de polimorfismos en los genes CDKN1A, 1C y 2A, y su relación con el riesgo de sufrir infarto de miocardio. Aunque el estudio no encuentra una relación significativa de los polimorfismos seleccionados con el riesgo de sufrir infarto, si que afirma que no puede excluirse la posibilidad de que otras variaciones polimórficas en esos genes puedan mostrar asociación con la enfermedad.

Hoja adicional

Por tanto, a la luz del estado de la técnica anterior, al elección de genes reguladores de ciclo celular como las ciclinas CCNB1, CCNA1 o CDKN1A, donde llevar a cabo detección de SNPs en estudios de asociación genotipo-fenotipo de patologías cardíacas, sería obvio para el experto en la materia que quisiera encontrar marcadores genéticos polimórficos alternativos a los existentes, en esos genes, siendo una cuestión rutinaria en este campo de la técnica, la realización de estudios de asociación genotipo-fenotipo. De hecho, en la presente solicitud se analizaron muchos más SNPs que los reivindicados, no siendo elegidos por su falta de asociación significativa con la restenosis.

Una vez seleccionados los SNPs cuya asociación riesgo-enfermedad es estadísticamente significativa, es obvio para el experto en la materia el diseño de cebadores para incluirlos en un kit de análisis.

Por tanto, las reivindicaciones 1-15 carecerían de actividad inventiva.