

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 292**

21 Número de solicitud: 201031004

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

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **29.06.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.09.2012

71 Solicitante/s:
**FUNDACIO INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL
UNIVERSITARI VALL D'HEBRON
PG. DE LA VALL D'HEBRON 119-129
08035 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:
**MONTANER VILLALONGA, JOAN;
DOMINGUES, SOPHIE y
FERNANDEZ CADENAS, ISRAEL**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

54 Título: **COMBINACION DE SNPs PARA DETERMINAR EL RIESGO DE SUFRIR UNA ENFERMEDAD
NEUROVASCULAR**

57 Resumen:

Combinación de SNPs para determinar el riesgo de sufrir una enfermedad neurovascular.

La presente invención se refiere a la detección de una predisposición a enfermedades neurovasculares en un individuo, y en particular al ictus. La presente invención se refiere a un método y un kit para la detección del riesgo de sufrir una enfermedad neurovascular, en particular ictus, en un individuo, que comprende la detección de una combinación de al menos dos polimorfismos de nucleótido único (SNPs), seleccionados del grupo que consiste en los SNPs rs7956957, rs310585, rs2276109, rs10275136, rs5742912 y rs10947803, así como a la propia combinación, los polinucleótidos que comprenden estos SNPs y sus usos.

ES 2 387 292 A1

DESCRIPCION

COMBINACIÓN DE SNPS PARA DETERMINAR EL RIESGO DE SUFRIR
UNA ENFERMEDAD NEUROVASCULAR

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la detección de una predisposición a enfermedades neurovasculares en un individuo, y en particular al ictus. La presente invención se refiere a un método y un kit para la detección del riesgo de sufrir una enfermedad neurovascular, en particular ictus, en un individuo, que comprende la detección de una combinación de al menos dos polimorfismos de nucleótido único (SNPs), seleccionados del grupo que consiste en los SNPs rs7956957, rs310585, rs2276109, rs10275136, rs5742912 y rs10947803, así como a la propia combinación, los polinucleótidos que comprenden estos SNPs y sus usos.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurovasculares suponen una carga enorme para el sistema de salud pública en todo el mundo. La patología neurovascular, en particular ictus, es la tercera causa de muerte y primera causa de discapacidad, ejerciendo un impacto negativo no sólo en la calidad de vida del paciente afectado, sino también en su familia, con un gran número de pacientes que sufren dependencia funcional más de un año después del evento [1]. Por otra parte, el coste para los sistemas de salud es grave porque incluye costes directos (hospitalización, rehabilitación, transporte, vigilancia médica, consumo de fármacos, etc.), y costes indirectos (pérdida de productividad de los pacientes y cuidadores, pérdida de actividad, mortalidad prematura, etc.). En general, el coste estimado del ictus en España es de 13.826 € el primer año, 8.945 € el segundo año y 7.739 € el tercer año por paciente [2]. Por lo tanto, existe una necesidad de detectar y prevenir estos accidentes cerebrovasculares.

Los presentes inventores han decidido estudiar la prevención de enfermedades neurovasculares desde el punto de vista genético. De hecho, existe una importante implicación genética en las enfermedades neurovasculares, descubierta en los años noventa en estudios con gemelos y estudios de agregación familiar, pero los genes responsables de esta herencia siguen siendo en gran parte sin ser determinados [3]. Por ejemplo, los estudios de análisis de ligamiento clásico o de asociación de genes candidatos han demostrado la asociación de los genes PDE4D, ALOX5AP, ApoE, IL6, TNF α o MTHFR con los ictus isquémicos, pero la replicación de estos resultados ha sido muy inconsistente [4]. Por otra parte, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han revelado la asociación de dos SNPs con ictus en el cromosoma 12p13 en población caucásica, sugiriendo un papel del gen NINJ2 [5], una asociación que ha sido contradicha posteriormente [6]. Además, un meta-análisis de GWAS en ictus isquémico en poblaciones caucásicas identificó una asociación del gen ZFHX3 en el cromosoma 16q22 con ictus [7]. Los genes PRKCH y CELSR1 se han asociado también con ictus isquémico en la población japonesa [8-9], pero estos marcadores deben ser validados en nuevos estudios. En cualquier caso, todos los estudios revelaron asociaciones con un pequeño efecto sobre la predicción global de la enfermedad. Del mismo modo, los factores de riesgo genético para el ictus hemorrágico aún no están definidos [3]. Sin embargo, la base genética de todas las enfermedades neurovasculares es probablemente idéntica ya que todos los genes candidatos identificados hasta la fecha están involucrados en los procesos fisiopatológicos comunes a todas las enfermedades neurovasculares, como la inflamación, angiogénesis, fibrinólisis, coagulación, hipertensión, enfermedad coronaria, angiogénesis, el metabolismo lipídico o la diabetes [3]. Además, las enfermedades neurovasculares

comparten los mismos factores de riesgo demográficos y clínicos como la presencia de ataques isquémicos transitorios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, fibrilación auricular, enfermedad cardiaca, angiopatía amiloide, obesidad, consumo o abuso de drogas, estilo de vida sedentaria, tabaquismo, medicación, consumo de alcohol y/o antecedentes familiares [3].

Basado en el hecho que las enfermedades neurovasculares son enfermedades complejas causadas por múltiples factores genéticos y ambientales, los inventores pensaron que la combinación de varios marcadores genéticos y variables clínicas tal vez podría revelar relaciones más sólidas con la enfermedad. Los inventores han divulgado en algunas conferencias (por ejemplo, "Predecir el riesgo genético de accidente cerebrovascular isquémico: Estudio de 250 polimorfismos en 1080 casos y controles", Conferencia de Genética Humana Europea, Viena el 23/5/2009) la posibilidad de que 5 SNPs localizados en los genes NOS3, LRP, SCNN1A y MMP12 podrían estar asociados con un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular isquémico en población española, aunque nunca se reveló la identidad de los SNPs implicados en dichos genes, ni se menciona ni sugiere utilizar estos SNPs en combinación como una herramienta de detección de riesgo de enfermedad cerebrovascular. Del mismo modo, el uso de una combinación de marcadores genéticos con factores de riesgo de enfermedad cerebrovascular con el fin de detectar personas con un elevado riesgo de ictus isquémico no se mencionó ni sugirió. Además, los inventores publicaron el artículo "KCNK17 genetic variants in ischemic stroke", en la revista Atherosclerosis (2009) [10], donde se reveló que el alelo A del SNP rs10947803 en el gen KCNK17 podría ser un marcador de riesgo para el accidente cerebrovascular isquémico, con un OR de 1,48, pero no se reveló ni se sugirió usar este SNP en asociación con otros SNPs para

predecir el riesgo de accidente cerebrovascular. El SNP rs5742912 del gen SCNN1A fue descrito en el artículo "Impact of eNaC Polymorphisms on the Risk of Ischemic Cerebrovascular Events: A Multicenter Case-Control Study", en la revista Clinical Chemistry (2005) [11], como 5 marcador de riesgo para el accidente cerebrovascular isquémico, con un OR de 3,26 en mujeres jóvenes homocigóticas para esta mutación. Sin embargo, no se realizó ninguna mención del uso de este SNP en asociación con otros marcadores para el diagnóstico de ictus isquémico, y ninguna mención del uso de este SNP como herramienta predictiva en asociación con otros marcadores para mejorar la detección de ictus. Varios artículos han sido publicados sobre accidentes cerebrovasculares en la población española (por ejemplo, "Human Vitamin K- 15 Dependent GA86: Gene Structure, Allelic Variation and Association with Stroke", Human Mutation (2004) [12], o "Alpha (1)-antichymotrypsin polymorphism: a risk factor for hemorrhagic stroke in normotensive subjects", Stroke (2001) [13]). Sin embargo, no hay ninguna divulgación en estos artículos de los polimorfismos descritos en la presente invención, ni de la posibilidad de combinar varios marcadores y factores de riesgo para crear un modelo predictivo de infarto. Por último, el artículo 25 "Association of three-gene interaction among MTHFR, ALOX5AP and NOTCH3 with thrombotic stroke: a multicenter case-control study", Human Genetics (2009) [14], describe un estudio genético de accidentes cerebrovasculares isquémicos en la población China, y sugiere que tres SNPs en los genes MTHFR, ALOX5AP y NOTCH3 podrían combinarse para mejorar el pronóstico de un accidente cerebrovascular isquémico. Sin embargo, este artículo sólo llega a predecir con una OR de 3,16 y no menciona los SNPs o genes descritos en la presente invención. En vista de los 35 conocimientos en el estado de la técnica, es necesario dar

a conocer una nueva herramienta para determinar el riesgo de sufrir enfermedades neurovasculares, en particular ictus. Un primer objetivo de la presente invención es dar a conocer nuevos marcadores genéticos para la prevención de las enfermedades neurovasculares, en particular ictus. Un segundo objetivo de la presente invención es dar a conocer un nuevo método y un nuevo kit para determinar la probabilidad de sufrir un accidente neurovascular, en particular ictus. En respuesta a estos objetivos, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que una combinación de los SNPs descritos en la presente invención es útil para determinar el riesgo de sufrir una enfermedad neurovascular, en particular ictus, y por lo tanto se puede desarrollar un método y un kit de uso de dicha combinación.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a una combinación de al menos dos polimorfismos de nucleótido único (SNPs), seleccionados entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos del riesgo de un individuo para sufrir una enfermedad neurovascular, en particular ictus. La presente invención se refiere también a un método para la determinación de una predisposición genética de enfermedades neurovasculares, en particular ictus, en un individuo, que comprende la detección de los alelos de al menos dos SNPs seleccionados del grupo que consiste en rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs5742912 y rs10947803 en una muestra de ácido nucleico aislado de un individuo. La presente invención se refiere además a un kit para determinar el riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, en particular ictus. La presente invención se refiere también al uso de la combinación mencionada anteriormente.

35

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Curvas ROC del modelo con los factores de riesgo clásicos de accidente cerebrovascular (edad, sexo masculino, hipertensión, tabaquismo y diabetes) con y sin adicción de las 6 variantes genéticas.

Figura 2. Porcentaje de controles y casos de accidentes cerebrovasculares en función del número de variantes genéticas.

Figura 3. Porcentaje de controles y casos de accidentes cerebrovasculares en función del número total de factores de riesgo.

Figura 4. Distribución de controles y casos de ictus por cada puntuación.

Figura 5. Porcentaje de controles y casos de accidente cerebrovascular en cada categoría propuesta por el modelo de riesgo de ictus.

Descripción detallada de la invención

1.- Definiciones y terminología

Las siguientes abreviaturas y siglas se utilizan en la presente invención:

ACM: arteria cerebral media

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CADASIL: arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy)

CeGen: centro de genotipado nacional

CI: intervalo de confianza

TCD: Doppler transcraneal

ECG: electrocardiograma

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GWAS: genome-wide association studies o estudio de asociación de genoma entero

- eNaC: canal de sodio epitelial
FDR: tasa de falsos positivos (False Discovery Rate)
HI: infarto hemorrágico
HT: transformación hemorrágica
5 HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg
IPA: Ingenuity Pathways Analysis
MAF: frecuencia de alelo minoritario
MELAS: Miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis
láctica e ictus
10 MRI: imágenes de resonancia magnética
mRS: escala de Rankin modificada
MMP: metaloproteinasa de matriz
NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale
OCSP: Oxfordshire Community Stroke Project
15 OR: odds ratio
ROC: Característica operativa del receptor
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PH: hematoma parenquimatoso
RMA: Robust Multiarray Averaging
20 SNP: single nucleotide polymorphism o polimorfismo de
nucleótido único
SPSS: paquete estadístico para las ciencias sociales
TC: tomografía craneal
TOAST: Prueba de ORG 10172 en el tratamiento del accidente
25 cerebrovascular agudo
t-PA: activador tisular del plasminógeno

Nombres de genes:

- p38-MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno p38
30 ALOX5AP: Proteína activadora de Araquidonato 5-
lipoxigenasa
ALOX12: araquidonato 12-lipoxigenasa
APOE: apolipoproteína E
C4a: componente de complemento 4A
35 C4b: componente de complemento 4B

ES 2 387 292 A1

- CDKN1A: inhibidor quinasa dependiente de ciclina 1A
(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)
CELSR1: cadherin EGF lag seven-pass G-type receptor 1
CLEC4C: C-type lectin domain family 4, member C
5 G0S2: G0/G1 switch 2
IL6: interleucina 6
ITGB3: integrina beta 3
KCNK17: canal de potasio, subfamilia K, miembro 17
LRP: proteína relacionada con el receptor de lipoproteína
10 de baja densidad
MMP: metaloproteinasa de matriz
MMP12: metaloproteinasa de matriz 12
MPL. Oncogén del virus de la leucemia mieloproliferativa
MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa
15 NEK1: NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1
NFkB: factor nuclear kappa-B
NINJ2: proteína inducida por lesión nerviosa 2
NOS3: óxido nítrico sintasa 3
PDE4D: fosfodiesterasa 4D
20 PITX2: paired-like homeodomain transcription factor 2
PPIA: ciclofilina A
PRKCH: proteína quinasa C, eta
SCNN1A: canal de sodio, no neuronal (nonvoltage-gated) 1,
subunidad alfa
25 TNF α : factor de necrosis tumoral alfa
ZFHX3: dedos de zinc homeobox 3
T: timina
C: citosina
A: adenina
30 G: guanina

El término "alelo", como se utiliza aquí, se refiere a una variante en la secuencia del gen.

Los términos "polimórficos" y "polimorfismo", como se usan aquí, se refieren a la condición en la cual dos o más
35 variantes de una secuencia genómica específica, o la

secuencia de aminoácidos codificados, se encuentran en una población. Los términos hacen referencia a la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos codificados, el uso se desprende del contexto. La región polimórfica o el sitio polimórfico se refieren a una región del ácido nucleico, donde se produce la diferencia de nucleótidos que distingue a las variantes, o, para las secuencias de aminoácidos, una región de la secuencia de aminoácidos donde se produce la diferencia de aminoácidos que distingue a las variantes de la proteína. Como se utiliza aquí, un "polimorfismo de nucleótido único" o "SNP", se refiere a un sitio polimórfico que consiste en una posición de un solo nucleótido.

El término "genotipo" se refiere a la descripción de los alelos de un gen o genes contenidos en un individuo o una muestra. Como se utiliza aquí, no se hace distinción entre el genotipo de un individuo y el genotipo de una muestra procedente de este mismo individuo. Aunque normalmente se determina un genotipo a partir de muestras de células diploides, un genotipo puede determinarse a partir de una muestra de células haploides, como por ejemplo una célula espermatozoica.

El término "odds ratio" o "OR" se refiere a la proporción entre la probabilidad de sufrir la enfermedad en personas con el marcador o polimorfismo en relación a la probabilidad de sufrir la enfermedad en individuos sin el marcador o polimorfismo.

El término "ácido polinucleótido aislado" o "ácido nucleico aislado", como se usa aquí, se refiere a un polinucleótido que está separado y/o recuperado de un ácido nucleico de secuencias de nucleótidos que normalmente flanquean la molécula de ácido nucleico y/o ha sido completamente o parcialmente purificado a partir de otro material biológico (por ejemplo, proteínas) que normalmente se asocian con el ácido nucleico. Asimismo,

dicho "ácido polinucleótido aislado" comprende variantes de polinucleótido donde han llevado a cabo una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones.

Por "oligonucleótido" se entiende un polímero de nucleótidos de cadena simple compuesta por más de 2 subunidades de nucleótidos unidas covalentemente.

El término "gen", como se utiliza aquí, se refiere no sólo a la parte estrictamente de codificación, sino también a las partes no codificantes.

El término "combinación", a menos que se indique lo contrario, se refiere aquí a la combinación o asociación de al menos dos SNPs seleccionados entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos de riesgo de enfermedad neurovascular, en particular ictus, de un individuo, en donde dichos SNPs están incluidos en una secuencia de polinucleótidos aislados como se define en este documento.

Cuando se hace referencia a los SNPs de esta invención y a los polinucleótidos que los comprenden, el término "una combinación de al menos dos" y en consecuencia el número exacto de "tres", "cuatro", "cinco" o "seis", no se pretende significar un grupo cerrado de un máximo de 6 SNPs o polinucleótidos correspondientes, sino también pueden incluir combinaciones con más SNPs o polinucleótidos correspondientes. En estas combinaciones, uno o más SNPs o polinucleótidos correspondientes pueden estar localizados o no en genes asociados a enfermedades neurovasculares, en particular accidentes cerebrovasculares, siempre y cuando dicho "al menos dos", "tres", "cuatro", "cinco" o "seis" corresponda a los SNPs y polinucleótidos correspondientes divulgados en la presente invención.

Por "variable clínica" se entiende la utilización de los datos demográficos indicativos de enfermedad neurovascular, en particular ictus, como la raza o el

origen étnico, edad, sexo y antecedentes familiares de enfermedad neurovascular, en particular ictus, así como el uso de la información clínica, tal como la presencia de ataques isquémicos transitorios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, fibrilación auricular, enfermedad cardíaca, angiopatía amiloide, obesidad, consumo o abuso de drogas, estilo de vida sedentaria, tabaquismo, medicamentos, consumo de alcohol y antecedentes de enfermedad neurovascular, en particular ictus,.

Por "genes asociados a enfermedad neurovascular" se entiende los genes que se ha descrito que están asociados a cualquiera de las enfermedades neurovasculares definidas más adelante en la presente invención.

Por " genes asociados a ictus" o "genes asociados a accidentes cerebrovasculares" se entiende los genes que se ha descrito que están asociados a la patología de ictus y/o a procesos relacionados funcionalmente con accidentes cerebrovasculares, tales como inflamación, fibrinólisis, coagulación, hipertensión, enfermedades del corazón, angiogénesis, metabolismo lipídico y diabetes.

El término "enfermedades neurovasculares" se refiere a enfermedades complejas del cerebro, de la médula espinal y/o de los vasos sanguíneos y a los factores de riesgo asociados a enfermedades complejas del cerebro, de la médula espinal y/o de los vasos sanguíneos, tales como pueden ser: ictus (también denominado de forma equivalente en la presente invención como "accidente(s) cerebrovascular(es)"), derrame cerebral, malformaciones arteriovenosas, trombosis, CADASIL, angiopatía amiloide cerebral, aneurisma, disección, hiper/hipotensión, encefalopatías, síndromes lacunares, Fabry, homocistinuria/homocisteinemia, hiper/hipoglucemia, hiper/hypolipidemia, diabetes, MELAS, acidemia metilmalónica, displasia fibromuscular, síndrome de Foix-

Alajouanine, lesión por reperfusión, accidente cerebrovascular hemorrágico, accidente cerebrovascular isquémico, cardioembolismo, aterotrombismo, malformaciones vasculares, amnesia global transitoria, ataques isquémicos transitorios, traumatismos, infecciones neurológicas, convulsiones, trastornos degenerativos, epilepsia, cardiopatía, dolor de cabeza y migrañas, tumores, inflamación, desmielinización, alteraciones de la circulación, neurodegeneración, demencia, Alzheimer, Parkinson, síndrome de Down, afasia, apraxia, trastornos psiquiátricos, trastornos de abuso de sustancias y drogas, trastornos cognitivos, esquizofrenia, trastornos del sueño.

Por "población mediterránea" se entiende las personas originarias o residentes de cualquier de los siguientes estados o territorios: España, Francia, Italia, Portugal, Mónaco, Malta, Eslovenia, Croacia, Bosnia y Herzegovina, Montenegro, Albania, Grecia, Turquía, Chipre, Siria, Líbano, Israel, Palestina, Egipto, Libia, Túnez, Argelia, Marruecos, Creta, Eubea, las Islas Pelagia, Gibraltar, Rodas, Lesbos, Ceuta, Melilla, Quíos, Cefalonia, Corfú, Naxos, Andros, Cerdeña, Córcega, Cres, Krk, Brač, Hvar, Pag, Korčula, Akrotiri y Dhekelia, Andorra, Jordania, San Marino, Ciudad del Vaticano, Macedonia y Serbia.

25

2.- Descripción

La presente invención se refiere a una combinación de al menos dos SNPs seleccionados entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, en particular ictus.

En una realización preferida, dicha combinación consiste en tres SNPs.

En una realización más preferida, dicha combinación consiste en cuatro SNPs.

35

En una realización más preferida, dicha combinación consiste en cinco SNPs.

En una realización la más preferida, dicha combinación consiste en seis SNPs.

5 En una realización particular, dichos al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis SNPs se combinan con uno o más de los SNPs rs405509, rs4934, rs2720723, rs2295778, rs7193343, rs6007897, rs4044210 y rs2200733.

10 En otra realización, dichos polimorfismos de nucleótido único de acuerdo a las realizaciones anteriores se combinan con una o más variables clínicas asociadas a enfermedades neurovasculares. Preferiblemente, dicha variable clínica se selecciona entre edad, sexo, tabaquismo, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

15 Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular en las realizaciones anteriores es el ictus.

Como dichos SNPs están por naturaleza comprendidos en un polinucleótido o una molécula de ácido nucleico aislado, la presente invención se refiere también a la
20 combinación de al menos dos polinucleótidos aislados incluidos en genes asociados a enfermedades neurovasculares, comprendiendo cada uno de dichos polinucleótidos un SNP seleccionado entre los SNPs
25 rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, correspondiendo dichos polinucleótidos aislados a la SEC ID N ° 1 a 6. Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

30 SEC ID N ° 1 indica la posición del polimorfismo rs2276109 y su secuencia adyacente, donde el nucleótido N es el SNP en la posición 21 y puede ser un nucleótido A o G, siendo G el alelo asociado con la enfermedad neurovascular. rs2276109 se encuentra en el contig humano
35 NT_033899.7 en la posición cromosómica 102251001 del

cromosoma 11.

SEC ID N ° 2 indica la posición del polimorfismo rs10275136 y su secuencia adyacente, donde el nucleótido N es el SNP en la posición 21 y puede ser un nucleótido T o C, siendo el alelo C el asociado con la enfermedad neurovascular. rs10275136 se encuentra en el contig humano NT_007914.14 en la posición cromosómica 150514825 del cromosoma 7.

SEC ID N ° 3 indica la posición del polimorfismo rs310585 y su secuencia adyacente, donde el nucleótido N es el SNP en la posición 21 y puede ser un nucleótido G o A, siendo A el alelo asociado con la enfermedad neurovascular. rs310585 se encuentra en el contig humano NT_007914.14 en la posición cromosómica 150526188 del cromosoma 7.

SEC ID N ° 4 indica la posición del polimorfismo rs7956957 y su secuencia adyacente, donde el nucleótido N es el SNP en la posición 21 y puede ser un nucleótido C o G, siendo G el alelo asociado con la enfermedad neurovascular. rs7956957 se encuentra en el contig humano NT_029419.11 en la posición cromosómica 55889082 del cromosoma 12.

SEC ID N ° 5 indica la posición del polimorfismo rs10947803, también llamado rs9471058, y su secuencia adyacente, donde el nucleótido N es el SNP en la posición 21 y puede ser un nucleótido C o A, siendo A el alelo asociado con la enfermedad neurovascular. rs10947803 se encuentra en el contig humano NT_007592.14 en la posición cromosómica 39378588 del cromosoma 6.

SEC ID N ° 6 se indica la posición del polimorfismo rs5742912 y su secuencia adyacente, donde el nucleótido N es el SNP en la posición 21 y puede ser un nucleótido C o T, siendo el alelo T el asociado con la enfermedad neurovascular. rs5742912 se encuentra en el contig humano NT_009759.15, en la posición cromosómica 6328611 del

cromosoma 12.

Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular en las SEC ID N ° 1-6 es el ictus.

En una realización preferida, dicha combinación
5 consiste en tres polinucleótidos aislados incluidos en genes asociados a enfermedades neurovasculares, comprendiendo cada uno de dichos polinucleótidos un SNP seleccionado entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos
10 del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, correspondiendo dichos polinucleótidos aislados a las SEC ID N ° 1 a 6. Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

En una realización preferida, dicha combinación
15 consiste en cuatro polinucleótidos aislados incluidos en genes asociados a enfermedades neurovasculares, comprendiendo cada uno de dichos polinucleótidos un SNP seleccionado entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos
20 del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, correspondiendo dichos polinucleótidos aislados a las SEC ID N ° 1 a 6. Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

En una realización preferida, dicha combinación
25 consiste en cinco polinucleótidos aislados incluidos en genes asociados a enfermedades neurovasculares, comprendiendo cada uno de dichos polinucleótidos un SNP seleccionado entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos
30 del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, correspondiendo dichos polinucleótidos aislados a las SEC ID N ° 1 a 6. Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

En una realización preferida, dicha combinación
35 consiste en seis polinucleótidos aislados incluidos en

genes asociados a enfermedades neurovasculares, comprendiendo cada uno de dichos polinucleótidos un SNP seleccionado entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, correspondiendo dichos polinucleótidos aislados a las SEC ID N ° 1 a 6. Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

En otra realización particular, los alelos de dichos SNPs se deducen mediante pruebas genéticas de otros marcadores o midiendo los niveles de actividad o concentración de las proteínas, o los correspondientes niveles de expresión de ARN de NOS3, SCNN1A, KCNK17, MMP12 y/o LRP. Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

En una realización particular, dicha combinación de SNPs o los correspondientes polinucleótidos aislados se encuentran en un individuo perteneciente a la población mediterránea. En una realización más particular, dicho individuo pertenece a la población española. Preferiblemente, dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

Como se demostrará más adelante en la sección de métodos y resultados, dicha combinación de SNPs o los correspondientes polinucleótidos aislados, se puede aplicar a un nuevo modelo o método para determinar el riesgo genético de que un individuo pueda sufrir una enfermedad neurovascular, preferiblemente un ictus, y un kit para la aplicación de dicho método.

30

2.1.- Métodos

El objetivo de este estudio fue crear un modelo genético predictivo para el accidente cerebrovascular o ictus, aunque perfectamente ampliable a una enfermedad neurovascular tal como se define en este documento,

35

mediante el hallazgo de nuevos marcadores genéticos a través de uno de los estudios más grandes de asociación de genes candidatos realizado hasta ahora en el accidente cerebrovascular, incluyendo una réplica y un análisis funcional de los resultados obtenidos.

2.1.1.- Población de estudio

El diseño de estudio fue de un estudio caso-control, donde se utilizaron casos y controles de ictus recogidos como se describe a continuación. El tamaño de la muestra se calculó con el programa Ene 2.0 para obtener una potencia de 0,80 con un nivel de significancia de 0,05 y una diferencia del 6% entre las frecuencias de los alelos de casos y controles.

- 531 pacientes consecutivos con ictus isquémico en el territorio vascular de las arterias cerebrales basilar o media (ACM) y admitido en el servicio de urgencias de un hospital universitario en las primeras 3 horas después de la aparición de síntomas fueron reclutados. El inicio del accidente cerebrovascular se define como la última vez que se determina que el paciente estuvo sin ningún tipo de déficit neurológico. Todos los pacientes fueron sometidos a exámenes urgentes por ecografía carotídea y Doppler transcraneal (TCD). Recibieron t-PA por vía intravenosa en una dosis estándar de 0.9-mg/kg (bolo 10%, 90% en infusión continua durante 1 hora). Los pacientes con una enfermedad clínicamente conocida inflamatoria o maligna fueron excluidos del análisis. Para identificar el mecanismo potencial de infarto cerebral, un conjunto de pruebas de diagnóstico se realizó que incluyeron electrocardiograma (ECG), radiografía de tórax, hemograma completo y diferencial de leucocitos, bioquímica de sangre, ecografía carotídea, contraste y tomografía craneal (TC) en todos los pacientes. Cuando esté indicado, algunos pacientes también se sometieron a pruebas especiales de coagulación,

imágenes de resonancia magnética (MRI), ecocardiografía transtorácica y monitorización por Holter ECG. Teniendo en cuenta esta información, subgrupos etiológicos previamente definidos se determinaron según los criterios TOAST [1] y también por criterios de la Comunidad Oxfordshire (OCSP), basados en los síntomas clínicos, localización y extensión del infarto cerebral [2]. El examen clínico se realizó al ingreso y a las 12, 24 y 48 horas después del inicio de los síntomas y todos los días hasta el alta. Se evaluó la gravedad del accidente neurovascular mediante el uso de la escala de NIHSS [3]. Se definieron la mejoría neurológica como una disminución en la puntuación ≥ 4 puntos y el deterioro neurológico como la muerte o un aumento en la puntuación de > 4 puntos a las 48 horas [4]. El resultado funcional fue definido por la escala de Rankin modificada (mRS) >2 , 3 meses después del ictus. Los exámenes TCD se realizaron en el servicio de urgencias antes de la administración de t-PA (<3 horas). La presión arterial sistólica, diastólica y la frecuencia cardíaca se midieron en el momento de cada examinación de TCD. El examen TCD se realizó con el dispositivo Multi-Dop X4 TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH), por un transductor de mano y un modo de onda pulsada con una frecuencia de 2 MHz. La oclusión proximal de ACM fue definida como la ausencia de flujo o la presencia de una señal de flujo mínimo en toda la ACM a una profundidad de insonación entre 45 y 65 mm [5]. La oclusión distal ACM se definió como una velocidad media en la zona afectada ACM $> 21\%$ en comparación con la ACM no afectada [6]. A sus ingresos, todos los pacientes se sometieron a una tomografía computarizada en las primeras 3 horas después del inicio del ictus. Ningún paciente con una hipodensidad $> 33\%$ en el territorio de la ACM recibió t-PA en este estudio. El TC se repitió posteriormente, de 24 a 48 horas más tarde (o antes, cuando se produjo un deterioro neurológico rápido) para

evaluar la presencia de transformación hemorrágica (TH). Las TC fueron revisadas por un neurorradiólogo con amplia experiencia en el ictus agudo. Presencia y tipo de HT se definieron de acuerdo a criterios previamente publicados [7-8]. El infarto hemorrágico (HI) se definió como infartos petequiales sin efecto masa y hematoma parenquimatoso (PH) se definió como hemorragias con efecto masa.

- 547 controles fueron reclutados en la unidad de ictus y en el laboratorio del hospital Vall d'Hebron de Barcelona entre 2007 y 2008. Todos los controles fueron mayores de 65 años de edad y se declararon sanos de demencia, enfermedad neurovascular y/o cardiovascular, evaluados mediante por entrevista antes de la extracción de sangre. Los pacientes con historia familiar de primer o segundo grado de enfermedad neurovascular fueron excluidos del estudio.

Una historia detallada de los factores de riesgo vascular se ha obtenido de cada participante. El tabaquismo se definió como fumar o haber fumado en alguna ocasión. La hipertensión se definió como una presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg y presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg, historia de hipertensión auto-reportada y/o tratamiento para la hipertensión. La diabetes mellitus se definió por historia de diabetes auto-reportada y/o tratamiento de diabetes tipo 2. La dislipidemia fue definida por niveles lipídicos elevados (colesterol > 200 mg/dL o triglicemia > 200 mg/dL), historia reportada y/o cualquier tratamiento. El consentimiento informado se obtuvo de cada participante del estudio y todos los sujetos presentaban ascendencia europea. El comité ético del hospital aprobó el estudio.

2.1.2.- Genotipado y asociaciones de SNPs

221 SNPs en 135 genes candidatos elegidos en la

literatura por sus funciones putativas en enfermedades neurovasculares y en procesos relacionados funcionalmente con estas enfermedades, como inflamación, fibrinólisis, coagulación, hipertensión, enfermedad coronaria, angiogénesis, metabolismo lipídico o diabetes fueron analizados de la siguiente manera. El ADN genómico se extrajo de cada muestra de 1 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA mediante métodos estándar. Los SNPs se genotiparon por SNPlex™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, EE.UU.) en el centro de genotipado nacional español (CeGen), con tasa de éxito de más de 90%. Cinco genes fueron analizados en su totalidad por Tag-SNPs, definidos por los datos del HapMap utilizando pairwise tagger $r^2 \geq 0,8$ y una frecuencia del alelo menor $>0,1$: MMP9, NOS3, VEGF, LRP y IL6. Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se evaluó mediante una prueba χ^2 con 1 grado de libertad. Una prueba χ^2 o de Fisher, en su caso, se utilizó para comparar variables categóricas entre grupos. La corrección de Bonferroni se utilizó para dar cuenta de las pruebas múltiples. Los tests de Student o Krustal-Wallis se usaron para comparar variables continuas, según correspondiera. Las odds ratio (ORs) con intervalos de confianza (IC) de 95% para el efecto sobre el riesgo de ictus isquémico fueron estimadas por regresión logística. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 15.0 ©.

La asociación acumulada de los SNP individuales asociados positivamente se calculó en función del número de alelos de riesgo llevados (de 0 a 6) y de la combinación de alelos de los 6 SNPs llevada (de los $2^6 = 64$ combinaciones posibles). El análisis se realizó bajo un modelo aditivo, teniendo en cuenta la etapa 1, etapa 2 y la base de datos global. A continuación se realizó una regresión logística, incluyendo cada variable y las probabilidades predictivas fueron registradas. Se

realizaron 2 curvas ROC, una con los factores de riesgo y otra con los factores de riesgo y variantes genéticas, para explorar la relación entre la sensibilidad y especificidad de una prueba clínica para el riesgo de accidente cerebrovascular. También se calculó la diferencia entre las áreas bajo las curvas con el programa MedCalc. Por último, la combinación de variantes genéticas y clínicas realizadas por cada individuo se utilizó para desarrollar un modelo predictivo de riesgo de accidente cerebrovascular y para determinar las categorías de riesgo para ictus.

2.1.3.- Análisis funcional

Se extrajo ARN de controles sanos y se midió la expresión mediante PCR cuantitativa en tiempo real de los genes KCNK17, LRP, SCNN1A y MMP12. La fracción de glóbulos blancos se obtuvo tras la centrifugación de sangre total conservada en EDTA durante 15 minutos a 3500 rpm, y se conservó en RNAlater ® a -80 °C. El ARN total fue aislado por RiboPure-Blood™ Kit (Ambion ®, Foster City, EE.UU.). La síntesis del cDNA se realizó utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, EE.UU.). Los niveles de ARNm se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando un protocolo estándar de kit TaqMan® PCR y sondas TaqMan fluorogénicas (LRP: Hs00233856_m1, SCNN1A: Hs00168906_m1, MMP12: Hs00159178_m1) mediante tecnología 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems Inc., Foster City, EE.UU.). El gen Cyclophilin A (PPIA) se usó para normalizar los resultados (Hs99999904_m1). Todas las reacciones se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos y se analizaron con el Applied Biosystems SDS 7500 system software (Applied Biosystems Inc., Foster City, EE.UU.). Los resultados se expresan en porcentaje en comparación a una muestra calibrador que se utiliza en

todos los experimentos.

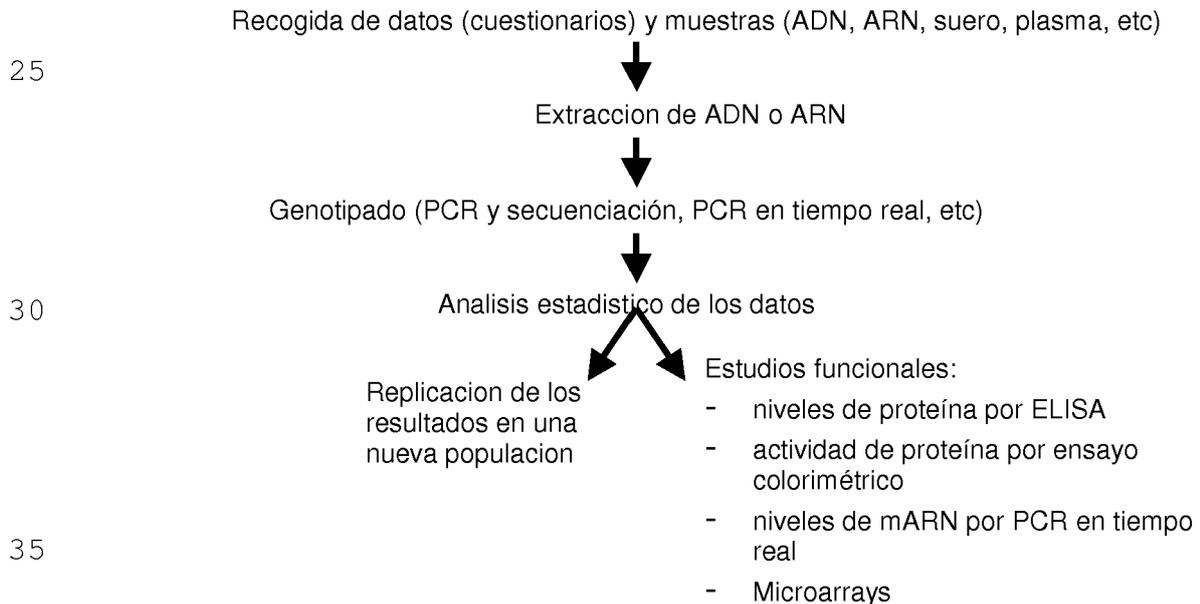
Los niveles de proteína MMP12 se midieron a partir de suero de controles mediante Fluorokine® MMP12 Analyte Profiling en placas de 96 pocillos. Cada muestra se concentró de 500µL a 100uL con Microcon® (Millipore™, Billerica, EE.UU.) y se analizaron dos veces según las instrucciones del fabricante, las muestras se midieron en un analizador Luminex (Human MMP Base Kit, Fluorokine® MAP, R & D Systems, Minneapolis, EE.UU.). La actividad de la proteína NOS3 fue analizada a partir de plasma de controles por Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit en placas de 96 pocillos. Cada muestra se concentró desde 500µL hasta 100uL con Microcon® (Millipore™, Billerica, EE.UU.) y se analizó dos veces según las instrucciones del fabricante (Catalog nº780001, Cayman™, Ann Arbor, USA).

2.1.4.- Microarrays y análisis por Ingenuity Pathways

Se extrajo ARN de 12 sujetos. Tubos con EDTA se centrifugaron a 3500RPM durante 15 minutos para obtener la fracción de glóbulos blancos. El kit RiboPure™ -Blood de Ambion (Ambion, Woodward st. Austin, EE.UU.) fue el empleado para extraer el ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN de la globina de los eritrocitos de muestras de sangre que provoca interferencias en los estudios con microarrays fue eliminado utilizando el kit de Globin-Clear (Ambion, Woodward st. Austin, EE.UU.). Las imágenes fueron procesadas con el Microarray Analysis Suite 5.0 (Affymetrix). Todas las muestras mostraron características de alta calidad y se sometieron a análisis posteriores. Los valores de expresión crudos obtenidos directamente de archivos CEL fueron pre-procesados por el método de RMA, un proceso de tres pasos que integra corrección de valores de fondo, normalización y resumen de valores de las sondas. Estos valores normalizados fueron

la base para todos los siguiente análisis. La selección de genes expresados diferencialmente se basó en un análisis con el modelo de Bayes. Los valores de p se usaron para clasificar los genes con mayor o menor cambios de expresión. Los valores de p se ajustaron utilizando la corrección por falso positivo (FDR) y el método de Benjamini Hochberg. Los genes asociados de forma más significativa se destacaron gráficamente utilizando gráficas de tipo volcanes con, en horizontal, la amplitud del cambio de expresión y, en vertical, los valores de p obtenidos. La importancia biológica de los cambios observados se estimó comprobando si los genes que resultaron ser expresados diferencialmente parecían estar concentrados o particularmente ausentes de algunas categorías del Ontology. Finalmente, con el software Ingenuity Pathways (IPA) se evaluaron las relaciones entre los genes asociados significativamente con los genotipos del LRP. Los resultados se registraron en el IPA, y las asociaciones entre las moléculas significativas con otras moléculas, sus funciones y su participación en redes moleculares y en enfermedades se registro. El protocolo usado para el estudio fue el siguiente:

Esquema 1



2.2.- Resultados

2.2.1.- Análisis genético

El análisis estadístico y el genotipado de las muestras se realizaron en dos etapas distintas. En total, los casos de ictus isquémico se dividieron dependiendo de la etiologías en cardioembolicos (50%), aterotromboticos (23%) e indeterminados (27%). No había diferencias significativas entre los casos y controles de la etapa 1 contra los casos y controles del etapa 2. Los factores de riesgo establecidos como por ejemplo el género masculino, la edad, diabetes, hipertensión y el tabaquismo se observaron con una frecuencia mas elevada en el grupo de ictus (Tabla 1).

22 SNPs se excluyeron del análisis debido a la frecuencia del alelo menor (MAF) inferior a 1% y 33 SNPs se excluyeron por fallo de genotipado en cualquier fase del análisis, por lo que el análisis estadístico final incluyó 166 SNPs. Teniendo en cuenta un modelo aditivo, un total de 25 SNPs se asociaron a ictus en al menos una etapa del análisis. Seis SNPs situados cerca o dentro de los genes KCNK17 (rs10947803), LRP1 (rs7956957), MMP12 (rs2276109), NOS3 (rs10275136 y rs310585) y SCNN1A (rs5742912) se asociaron con ictus isquémico, en las dos etapas del análisis (Tabla 2).

Tabla 1. Características de la población de estudio

	Total (n=1062)		valor de p
	Controles (n=535)	Cases (n=527)	
Edad, años \pm DE	71.6 \pm 7.1	70.7 \pm 12.0	<0.05
Hombres, n (%)	230 (42.5)	287 (54.5)	<0.001
Fumadores, n (%)	68 (12.6)	130 (25.9)	<0.001
Hipertensión, n (%)	239 (44.2)	308 (59.2)	<0.001
Diabetes mellitus, n (%)	44 (8.2)	120 (22.9)	<0.001
Dislipidemia, n (%)	155 (28.7)	173 (33.1)	<0.05

Tabla 2. SNPs asociados significativamente a ictus en las 2 etapas del análisis

Etapa 1					
Valor de					
SNP	Riesgo	Controles	Casos	p	OR (95% IC)
rs10947803	A	17.8	25.3	0.003	1.57 (1.16-2.11)
rs7956957	G	63.0	70.0	0.0261	1.37 (1.04-1.80)
rs2276109	G	9.7	17.7	0.0003	2.00 (1.37-2.91)
rs10275136	C	93.5	97.2	0.0137	2.35 (1.17-4.73)
rs310585	A	46.4	58.1	0.0005	1.60 (1.23-2.09)
rs5742912	T	86.8	96.5	3.1E-07	4.19 (2.33-7.54)
Etapa 2					
Valor de					
SNP	Riesgo	Controles	Casos	p	OR (95% IC)
rs10947803	A	17.8	23.5	0.012	1.42 (1.08-2.12)
rs7956957	G	64.4	70.7	0.0415	1.33 (1.01-1.76)
rs2276109	G	9.7	14.0	0.0405	1.51 (1.02-2.25)
rs10275136	C	93.5	97.6	0.0046	2.89 (1.34-6.20)
rs310585	A	44.9	55.4	0.0038	1.52 (1.14-2.03)
rs5742912	T	93.8	97.2	0.0127	2.31 (1.18-4.55)
Total					
Valor de					
SNP	Riesgo	Controles	Casos	p	OR (95% IC)
rs10947803	A	17.8	24.2	0.003	1.48 (1.14-1.91)
rs7956957	G	63.7	70.3	0.0027	1.35 (1.11-1.64)
rs2276109	G	9.7	15.9	4.3E-05	1.76 (1.34-2.31)
rs10275136	C	93.5	97.4	0.0002	2.59 (1.55-4.34)
rs310585	A	45.7	56.7	7.9E-06	1.56 (1.28-1.89)
rs5742912	T	91.0	96.8	2.5E-07	3.05 (1.96-4.75)

Curiosamente, la combinación de seis SNPs mostró una clara contribución al riesgo de ictus en comparación con el riesgo acumulado obtenido por los factores de riesgo

clínicos convencionales, incluyendo edad, sexo, tabaquismo, hipertensión y diabetes, con áreas bajo la curva ROC de 0,687 (95% IC: 0,589-0,669) contra 0,629 (IC 95%: 0,649 a 0.725) (Figura 1). Además, el riesgo aumenta con el número de variantes genéticas que presenta el paciente (Figura 2), y el riesgo aumenta con la cantidad de marcadores genéticos y/o variable de riesgo clínicos presentes, aunque nadie en nuestra población presentaba más de 9 factores de riesgo (Figura 3). Por último, se diseñó un modelo predictivo de riesgo para crear categorías de bajo a alto riesgo de ictus. Las seis variables clínicas y seis variantes genéticas replicadas se introdujeron en el modelo. Todas las variables son independientes unas de la otras. El test de Hosmer y Lemeshow mostró que nuestro modelo se adapta muy bien a los datos. Una puntuación de riesgo se asignó a cada variable y una escala de riesgo de 1 a 45 (Figura 4) se utilizó para clasificar a los sujetos en tres categorías. El riesgo de ictus fue definido como bajo (puntuación \leq 18), moderado ($19 < \text{puntuación} \leq 26$) o alto ($26 < \text{puntuación}$) (Figura 5).

2.2.2.- Análisis funcionales

La expresión génica de SCNN1A, medida en 26 controles sanos, reveló que los portadores de TT tenían niveles de ARNm significativamente superiores a los TC y CC (TT: $109 \pm 40\%$, CT: $60 \pm 28\%$, CC: $58 \pm 25\%$, $p = 0,005$). Sin embargo, la expresión génica de LRP1 se determinó en 18 controles sanos, pero ninguna asociación se observó entre el SNP rs7956957 y los niveles de ARNm (GG: $114 \pm 73\%$, CG: $105 \pm 60\%$, CC: $96 \pm 47\%$, $p = 0.578$). Además, los niveles de ARNm del gen KCNK17 dependían de los alelos del SNP rs10947803 ($p = 0,021$). Los portadores del alelo A presentan niveles más altos que los C ($114 \pm 35\%$, $n = 5$ vs $77 \pm 38\%$, $n = 8$). Por otra parte, la actividad de la proteína NOS3 determinada en 80 controles sanos reveló que

los dos alelos de riesgo para ictus, los SNPs rs310585 y rs10275136, se asociaban a niveles menores de actividad de la proteína (A: $6,8 \pm 2,0$ mM, G: $8,0 \pm 3,4$ mM, $p = 0,005$ y C: $7,2 \pm 2,7$ mM, T: $8,8 \pm 3,6$ mM, $p = 0,027$). Por otro lado, la expresión génica del MMP12 no se pudo detectar en 12 controles sanos. Sin embargo, los niveles de proteína MMP12 se determinaron en 14 controles sanos por Lumindex y solo pudimos detectar unos niveles muy bajos de MMP12 en 6 muestras, pero ninguna asociación con los genotipos del SNP rs2276109 (AA: $22,4 \pm 13,3$ años, AG: $18,1 \pm 12,8$, AP: $11,6$ pg / mg de proteína total, $p = 0,704$). Por último, el análisis por microarrays en 12 sujetos revelaron que los genotipos del SNP rs7956957 del gen LRP se asocian con la expresión de varios genes después de corrección por la tasa de descubrimiento falso (FDR) y el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) identificó varias redes asociadas a los genotipos del LRP. Notablemente, el alelo de riesgo del SNP rs7956957 (alelo G) se asoció con una menor expresión de genes implicados en procesos inflamatorios, tales como CLEC4C o los complementos 4A y 4B (C4A y C4B), mientras que se asoció con un incremento de la expresión de genes implicados en apoptosis como ITGB3, ALOX12, NEK1 o G0S2.

2.3.- Discusión

En este estudio caso-control, los inventores analizaron la asociación de 221 SNPs funcionalmente relacionados con las enfermedades neurovasculares en una población mediterránea. Tras el análisis multivariante, ajustado por factores de riesgo convencionales, los inventores podrían replicar una asociación estadísticamente significativa entre seis SNPs (rs10947803, rs7956957, rs2276109, rs10275136, rs310585 y rs5742912) y el riesgo de accidentes neurovasculares, o ictus.

El SNP rs5742912 del gen SCNN1A es un cambio de aminoácido importante al nivel estructural de la proteína se trata de un cambio triptófano por arginina (Trp493→Arg), cambiando un aminoácido cíclico no polar por un aminoácido de carga positiva. El gen codifica una subunidad de la proteína ENaC, un canal de sodio que está presente en las células epiteliales, junto con otras dos subunidades, SCNN1B y SCNN1G [15]. El papel de esta proteína en la homeostasis del sodio, osmolaridad plasmática y la regulación de la presión arterial lo ha convertido en un candidato ideal para estudiar el desarrollo de enfermedades complejas como el ictus, el infarto de miocardio o la insuficiencia renal [16]. De hecho, el eNaC es importante por el paso limitante en la velocidad de reabsorción de sodio y es sensible al amiloride, un diurético que puede bloquear el canal de sodio e inhibe su asimilación, utilizado en el tratamiento de la hipertensión e insuficiencia cardíaca congestiva [17]. A nivel genético, el SNP rs5742912 de SCNN1A se ha asociado con el ictus isquémico [11]. En nuestro estudio, la asociación resistió corrección de Bonferroni y alcanzó un valor de p de 2.5E-07 y un OR de 3,59, valores muy bajos para un estudio de genes candidatos. Los inventores también demuestran aquí por primera vez que este SNP está asociado a niveles de ARNm del gen SCNN1A, y los portadores del alelo de riesgo T mostraron niveles significativamente más elevados que los portadores del alelo C. Al ser un SNP no sinónimo, esperamos que pudiera afectar a la actividad de la proteína además del ARNm, sobre todo porque el SNP se encuentra en el dominio extracelular, donde se unen diferentes ligandos y el amiloride. Estos resultados son consistentes con otros estudios que muestran que otras variantes de la subunidad α se asocian con aumentos de actividad de esta proteína en células epiteliales humanas [18]. Los inventores

observaron niveles mayores de ARNm asociados con el alelo de riesgo T, que es también el alelo más común. El gen SCNN1A se encuentra en el cromosoma 12p13, donde un GWAS
5 genético del gen NINJ2 y el ictus, lo que indica que esta región podría ser de hecho una región importante de susceptibilidad para sufrir un accidente cerebrovascular [5].

Otro SNP localizado en el cromosoma 12 se asoció con
10 ictus isquémico en nuestro estudio. De hecho, el alelo G del rs7956957 del gen LRP1 en el locus 12q13 fue identificado como factor de riesgo en todas las etapas de nuestro estudio y en todas las etiologías de ictus, aunque no se asoció a los niveles de ARNm. El SNP está en
15 ligamiento con muchos otros SNPs del gen, aunque el único SNP funcional descrito (C766T o rs1799986) se encuentra en otra región diferente del gen, compuesto de 89 exones, y no está en desequilibrio de ligamiento con el SNP rs7956957. Nada se sabe sobre este SNP (rs7956957), se
20 trata de un SNP intrónico que se seleccionó en este estudio como un Taq-SNP para LRP1. El efecto del rs7956957 en ictus se examinó también mediante microarrays e identificamos varios genes interesantes asociados a los genotipos del rs7956957 como ALOX12, ITGB3, MPL, C4a y
25 C4b. Una representación combinada de las dos redes principales identificadas por el software IPA reveló que los genes implicados podrían tener un papel importante en los procesos biológicos de apoptosis, señalización celular, muerte celular e inflamación. La fusión de estas
30 redes indica también que algunos genes como el LDL, NFκB, CDKN1A, y p38-MAPK podrían ser reguladores importantes de estas redes. El mecanismo del efecto del rs7956957 en el ictus isquémico todavía no está claro pero podría ser debido a una modulación de la actividad de la proteína ya
35 que no afecta a la expresión de ARNm del LRP1, aunque los

resultados indicaron que los casos de ictus presentaban niveles significativamente más bajos de ARNm que los controles sanos.

Otros dos genes que han sido identificados en nuestro estudio, MMP12 y NOS3, están involucrados en procesos de inflamación. La proteína MMP12 se ha relacionado con accidente cerebrovascular isquémico, gracias a su papel en la estabilidad de la placa aterosclerótica, mientras que el gen MMP12, localizado en el cromosoma 11q22 se ha relacionado con la enfermedad coronaria y el ictus hemorrágico [21-22]. El SNP rs2276109 se asoció con accidente cerebrovascular isquémico en nuestra cohorte. Es una sustitución de A por G en la región promotora del gen, y se ha demostrado ser funcional, al influir en la capacidad de unión del factor de transcripción AP -1 en ensayos de electromobilidad [23]. El alelo A se asocia con una mayor actividad del promotor de MMP12 *in vitro* en los estudios de transfección transitoria, y se asocia con un menor riesgo de ictus isquémico en nuestro estudio. Por tanto, parece que una disminución de actividad del promotor de MMP12, a través del alelo G del SNP rs2276109, podría estar asociada con un mayor riesgo de ictus. La expresión génica y los niveles de proteína de MMP12 se midieron en controles sanos, con el fin de entender mejor la contribución de la variante rs2276109, pero los niveles de ARNm y proteínas eran apenas perceptibles e insuficientes para sacar conclusiones. Se utilizaron muestras de sangre, mientras que la MMP12 se manifiesta, principalmente, en macrófagos activados y células del estroma, lo que podría explicar por qué no se detectó.

El NOS3, en el cromosoma 7q36, también se asoció con ictus en este estudio. De hecho, se observó una asociación de dos SNPs en este gen, rs10275136 y rs310585, este último llegando a valores de p de 7.9E-06. Ambas asociaciones resistieron la corrección de Bonferroni.

Estos 2 SNPs no están en desequilibrio de ligamiento y, por tanto son independientes entre ellos y se ubican en la región 5 'del NOS3. Se seleccionaron para este estudio como Tag SNPs y su función es desconocida. La proteína NOS3, también conocida como eNOS o cNOS participa en muchos procesos biológicos, incluyendo la hipertensión y los espasmos coronarios [24]. Cataliza la generación de óxido nítrico en los vasos sanguíneos a partir de L-arginina, y es particularmente importante en la señalización celular y la regulación de la función vascular [25]. A nivel genético, algunos polimorfismos en este gen se han asociado con ictus, infarto de miocardio, hipertensión y cardiopatía coronaria [26]. Curiosamente, mientras que los 3 otros SNP se asociaron con todos los subtipos de ictus isquémico, estas dos variantes son específicas de la etiología cardioembólica, lo que indica que podrían estar asociados con otros trastornos cardiovasculares. Por otra parte, los dos alelos de riesgo se asociaron con una menor actividad de la proteína NOS3 y los casos de ictus presentaron niveles más bajos que los controles sanos, lo que indica que niveles bajos de NOS3 podrían ser factores de riesgo para ictus. De hecho, esta hipótesis esta en concordancia con estudios anteriores que muestran que NOS3 es un regulador importante del flujo sanguíneo cerebral, especialmente durante la isquemia cerebral, donde se ha demostrado que presenta efectos neuroprotectores a través de una perfusión mejor y un tamaño de ictus menor [27-28].

El alelo A del SNP rs10947803 del gen KCNK17 se asoció independientemente con ictus isquémico en este estudio con una OR de 1,47 (p = 0,010). Poco se sabe sobre el gen KCNK17, pero se expresa ampliamente, sobre todo en hígado, pulmón, placenta, páncreas, intestino y aorta [29]. Niveles altos de mRNA del gen KCNK17 se asociaron con un mayor riesgo de ictus isquémico. El mecanismo de

esta asociación se desconoce y el SNP es intrónico y por lo tanto no pertenece a la región promotora del gen. La proteína codificada por el gen KCNK17 es un miembro de la superfamilia de canales de K^+ [29-30]. Estos canales regulan los flujos celulares de iones y en consecuencia el volumen celular, así como la acidosis metabólica y la hipotensión provocada por la secreción de HCO^{-3} [31-34] y teniendo en cuenta su función y su localización en muchos tejidos, podría desempeñar un papel importante en el ictus, siendo un disparador principal común a todos los subtipos de ictus.

En resumen, se observó que seis SNPs fueron factores de riesgo independientes de ictus en la población española. Cuatro de estos SNPs, en los genes KCNK17, SCNN1A y NOS3, mostraron una clara influencia sobre la función del gen o la proteína correspondiente, y un SNP en el gen MMP12 tenía también un efecto claro como se describe en otro estudio [23].

A continuación se evaluó la asociación acumulada de estas variantes. El principal objetivo era establecer si la combinación de al menos dos de estos SNP, preferiblemente tres SNP, mejor cuatro SNPs, todavía mejor cinco SNP, y el óptimo seis SNPs, podría predecir el riesgo de accidente cerebrovascular mejor que cada SNP de forma individual, y si los inventores podrían mejorar la discriminación entre los sujetos de riesgo, en combinación con factores de riesgo clásicos, en contraste con los factores de riesgo clásicos solos. Los resultados de este análisis mostraron que el riesgo aumentó gradualmente con el número de alelos del riesgo portados. De hecho, la asociación acumulada de los seis SNPs tenía un valor de predicción positiva superior a la adición del OR de cada SNP de forma individual. Los portadores de todos los alelos de susceptibilidad presentaban un riesgo de ictus de casi el 100% comparándolo con controles sanos. Por otra

parte, la contribución de la información genética con factores de riesgo clásicos era significativa, como se indica en la gráfica de las curvas ROC con los factores clínicos o clínicos y genéticos, así que los inventores
5 asignaron una puntuación a cada SNP y cada factor de riesgo convencional, en función de su efecto sobre el ictus. El modelo predictivo obtenido finalmente permito la distinción de varias categorías de riesgo ictus, para clasificar a los sujetos en categorías de riesgo bajo,
10 moderado o alto. Los inventores creen que este modelo podría ser un instrumento importante en medicina preventiva, ya que el ictus supone una carga enorme para el sistema de salud y sobre todo para los pacientes. Ellos podrían beneficiarse de una prevención primaria
15 individualizada y específica. De hecho, la combinación de SNPs presentada aquí podría aportar información clínica nueva e importante por lo menos al mismo nivel que factores de riesgo clásicos como la hipertensión, el tabaquismo o la diabetes. Los resultados obtenidos en este
20 estudio permitirán clasificar mejor los individuos que presentan un riesgo moderado basado en factores clínicos, y que podrían realmente pertenecer al grupo de alto riesgo según este modelo de combinación genética y clínica.

En este estudio, los inventores encontraron
25 sorprendentemente que a partir de una combinación de al menos dos de los SNPs descritos anteriormente, la predicción del riesgo medido era mejor que cualquier herramienta de predicción descrita en la literatura, y los inventores fueron capaces de prever que el riesgo
30 de sufrir un ictus aumentaba con el número de SNPs portados, como se muestra en la tabla adyacente. En otras palabras, la combinación de dos de los SNPs mencionados indicaba un riesgo individual de accidente cerebrovascular de al menos 3,417 veces más alto que una persona que, en
35 las mismas condiciones ambientales, no presenta ninguno de

estos SNPs. Como se muestra en la tabla, esta relación aumenta de manera dramática a medida que aumenta el número de SNPs, no sólo a través de un efecto sumatorio, sino a través de un efecto multiplicador, el modelo es óptimo cuando el número de SNPs es de seis. La combinación de al menos dos SNPs es entonces un buen modelo para predecir el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, pero la combinaciones de tres, cuatro o cinco SNPs es cada vez mejor hasta seis SNPs que es la combinación óptima de predecir el riesgo de accidente cerebrovascular.

Tabla 3. Combinaciones de SNPs significativamente asociados a ictus

Numero de SNPs	OR	95% IC
1	1	-
2	3.417	0.670-17.426
3	6.159	1.261-30.089
4	10.26	2.095-50.326
5+	26.056	4.672-145.308

15

Métodos y kits para su aplicación

La presente invención se refiere también a un método para la determinación de la predisposición genética a enfermedades neurovasculares, en particular ictus, en un individuo, que comprende la detección de los alelos de al menos dos SNPs seleccionados del grupo que consiste en rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs5742912 y rs10947803 en un una muestra de ácido nucleico aislado de un individuo.

En una realización preferida, dicho método se utiliza para determinar la predisposición genética a enfermedades neurovasculares, en particular ictus, en un individuo y

comprende la detección de los alelos de tres SNPs seleccionados del grupo que consiste en rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs5742912 y rs10947803 en una muestra de ácido nucleico aislado de un individuo.

5 En una realización más preferida, dicho método se utiliza para determinar la predisposición genética a enfermedades neurovasculares, en particular ictus, en un individuo y comprende la detección de los alelos de cuatro SNPs seleccionados del grupo que consiste en rs2276109,
10 rs10275136, rs310585, rs7956957, rs5742912 y rs10947803 en una muestra de ácido nucleico aislado de un individuo.

En una realización más preferida, dicho método se utiliza para determinar la predisposición genética a enfermedades neurovasculares, en particular ictus, en un
15 individuo y comprende la detección de los alelos de cinco SNPs seleccionados del grupo que consiste en rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs5742912 y rs10947803 en una muestra de ácido nucleico aislado de un individuo.

En la realización más preferida, dicho método se
20 utiliza para determinar la predisposición genética a enfermedades neurovasculares, en particular ictus, en un individuo que comprende la detección de los alelos de los seis SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs5742912 y rs10947803 en una muestra de ácido nucleico
25 aislado de un individuo.

En una realización particular, los alelos detectados de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores serían un alelo G de rs7956957, A de rs310585, G de rs2276109, C de rs10275136, T de rs5742912 y A de
30 rs10947803.

La muestra de ácido nucleico aislado del individuo utilizada en cualquiera de las realizaciones del método de la presente invención puede comprender ADN o ARN. Por otra parte, dicha muestra de ácido nucleico puede ser
35 amplificada, generalmente por una reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), de la forma establecida en la técnica.

La detección de los SNP puede realizarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo sin limitarse a éstos, mediante hibridación de una
5 sonda de ácido nucleico o de oligonucleótidos, o mediante marcadores radiactivos, enzimáticos, luminosos o fluorescentes [35: pagina 4183 y 36: páginas 246-247].

Dicha sonda o secuencia de oligonucleótido comprende una secuencia que es totalmente complementaria a una
10 secuencia de ácido nucleico que comprende los SNPs divulgada en la presente invención (SEC ID N ° 1 a SEC ID N ° 6).

En una realización preferida, la presente invención se refiere al método según cualquiera de las
15 realizaciones descritas anteriormente en el que por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis SNPs se combinan con una o más variables clínicas asociadas con una enfermedad neurovascular, en particular ictus.

Preferentemente, dichas variables clínicas se
20 seleccionan entre edad, sexo, tabaquismo, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

En una realización particular, la presente invención se refiere al método según cualquiera de las realizaciones
25 descritas anteriormente en el que los alelos de dichos SNPs se deducen mediante pruebas genéticas.

En otra realización, la presente invención se refiere al método según cualquiera de las realizaciones descritas
30 anteriormente en el que los alelos de dichos SNPs se deducen de los niveles de actividad o concentración de las proteínas, o de los correspondientes niveles de expresión de ARN de NOS3, SCNN1A, KCNK17, MMP12 y/o LRP, que son modulados por la presencia de los marcadores genéticos, tal como se muestra en la sección de resultados.

En una realización particular, la presente invención
35 se refiere al método según cualquiera de las realizaciones

descritas anteriormente en el que dichos al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis SNPs se combinan con los SNPs rs405509, rs4934, rs2720723, rs2295778, rs7193343, rs6007897, rs4044210 y rs2200733.

5 En una realización particular, la presente invención se refiere al método según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, que comprende además la comparación de la combinación de alelos obtenida para un individuo con la combinación de alelos obtenida para otro
10 individuo afectado por una enfermedad neurovascular, en particular ictus, y la detección de la predisposición genética a una enfermedad neurovascular, en particular ictus, si el individuo a ser analizado presenta la misma carga genética que el individuo afectado. En una
15 realización más preferida, dicho otro individuo tiene una relación familiar con el individuo a analizar.

Preferentemente, en todas las realizaciones del método anteriores dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

20 En una realización particular, el método según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente para determinar el riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, preferentemente ictus, se aplica a un individuo perteneciente a la población mediterránea.

25 En una realización más particular, dicho individuo pertenece a la población española.

La presente invención se refiere además un kit para determinar el riesgo de un individuo de sufrir una
30 enfermedad neurovascular, en particular ictus, que comprende:

(A) Dos o más sondas que permiten detectar los alelos de los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912.

35 (B) Instrucciones para usar el kit y determinar el riesgo

de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, en particular ictus, teniendo en cuenta la combinación de SNPs presentada.

En una realización preferida, se detectan dos SNPs asociados a una enfermedad neurovascular, en particular ictus.

En una realización preferida, se detectan tres SNPs asociados a una enfermedad neurovascular, en particular ictus.

En una realización más preferida, se detectan cuatro SNPs asociados a una enfermedad neurovascular, en particular ictus.

En una realización más preferida, se detectan cinco SNPs asociados a una enfermedad neurovascular, en particular ictus.

En la realización más preferida se detectan los seis SNPs asociados a una enfermedad neurovascular, en particular ictus.

Dichas dos o más sondas del kit pueden marcarse. De manera opcional, el kit puede comprender reactivos tales como soluciones de dilución, tampones de reacción, enzimas de polimerización y/o oligonucleótidos (cebadores). Al utilizar sondas marcadas radioactivamente, la hibridación puede ser detectada por autorradiografía, centelleo, contador o contador gamma.

En ciertas realizaciones del kit, éste puede comprender además oligonucleótidos (cebadores) para la amplificación o secuenciación y estos pueden ser específicos de las secuencias SEC ID N ° 1 a 6.

El kit también puede comprender también reactivos para el marcaje de uno o más de los oligonucleótidos específicos de secuencia, o puede comprender oligonucleótidos marcados específicos de secuencia. Los marcadores útiles incluyen radioisótopos, así como grupos no radioactivos. Los marcadores isotópicos incluyen ³H,

³⁵S, ³²P, ¹²⁵I, ⁵⁷Co y ¹⁴C. Los marcadores isotópicos pueden ser introducidos en el oligonucleótido mediante técnicas descritas en la literatura. Los marcadores no isotópicos pueden ser fluorescentes, de quimioluminiscencia, enzimas, cofactores, sustratos de la enzima, haptenos u otros ligandos.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al kit según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en el que dichos por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis SNPs se combinan con una o más variables clínicas asociadas con una enfermedad neurovascular, en particular ictus. Preferentemente, dichas variables clínicas se seleccionan entre edad, sexo, tabaquismo, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

En una realización particular, en el kit de acuerdo con las realizaciones anteriores, los alelos de dichos SNPs se deducen mediante pruebas genéticas de otros marcadores o midiendo los niveles de actividad o concentración de las proteínas, o los correspondientes niveles de expresión de ARN de NOS3, SCNN1A, KCNK17, MMP12 y/o LRP.

Preferentemente, en todas las realizaciones anteriores del kit, la enfermedad neurovascular es el ictus.

En una realización particular, dicho kit para determinar el riesgo individual de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, preferiblemente ictus, se aplica a un individuo perteneciente a la población mediterránea.

En una realización más particular, dicho individuo pertenece a la población española.

La presente invención se refiere además a la utilización de la combinación de al menos dos SNPs seleccionados entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912 y todas las

realizaciones de la combinación descritas en la presente invención en un kit para determinar el riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, preferiblemente el ictus.

5 En una realización particular, dicho uso se aplica a un individuo perteneciente a la población mediterránea.

 En una realización más particular, dicho individuo pertenece a la población española.

 La presente invención se refiere además a la
10 utilización de la combinación de al menos dos SNPs seleccionados entre los SNPs rs2276109, rs10275136, rs310585, rs7956957, rs10947803 y rs5742912, indicativos del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, preferiblemente el ictus, y todas las
15 realizaciones de la combinación descritas en la presente invención como una herramienta de prueba genética para una enfermedad neurovascular, preferiblemente el ictus.

 En una realización particular, dicho uso se aplica a un individuo perteneciente a la población mediterránea.

20 En una realización más particular, dicho individuo pertenece a la población española.

REFERENCIAS

1. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009; 119:e21-181.
2. Jorgensen N, Cabañas M, Oliva J, Rejas J, León T. The cost of informal care associated to incapacitating neurological disease having high prevalence in Spain. *Neurologia*. 2008; 23:29-39.
3. Domingues-Montanari S, Mendioroz M, del Rio-Espinola A, Fernández-Cadenas I, Montaner J. Genetics of stroke: a review of recent advances. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008; 8:495-513.
4. Domingues-Montanari S, Fernández-Cadenas I, Del Río-Espinola A, Corbeto N, Krug T, Manso H, Gouveia L, Sobral J, Mendioroz M, Fernández-Morales J, Alvarez-Sabin J, Ribó M, Rubiera M, Obach V, Martí-Fàbregas J, Freijo M, Serena J, Ferro JM, Vicente AM, Oliveira SA, Montaner J. Association of a genetic variant in the ALOX5AP gene with higher risk of ischemic stroke. A case-control, meta-analysis and functional study. *Cerebrovasc Dis*. 2010; 29:528-537.
5. Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS, Debette S, Lumley T, Folsom AR, van den Herik EG, Bos MJ, Beiser A, Cushman M, Launer LJ, Shahar E, Struchalin M, Du Y, Glazer NL, Rosamond WD, Rivadeneira F, Kelly-Hayes M, Lopez OL, Coresh J,

- Hofman A, DeCarli C, Heckbert SR, Koudstaal PJ, Yang Q, Smith NL, Kase CS, Rice K, Haritunians T, Roks G, de Kort PL, Taylor KD, de Lau LM, Oostra BA, Uitterlinden AG, Rotter JI, Boerwinkle E, Psaty BM, Mosley TH, van Duijn CM, Breteler MM, Longstreth WT, Jr., Wolf PA. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med.* 2009; 360:1718-1728.
- 5
6. International Stroke Genetics Consortium; Wellcome Trust Case-Control Consortium 2. Failure to validate association between 12p13 variants and ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2010; 362(16):1547-50.
- 10
7. Benjamin EJ, Rice KM, Arking DE, Pfeufer A, van Noord C, Smith AV, Schnabel RB, Bis JC, Boerwinkle E, Sinner MF, Dehghan A, Lubitz SA, D'Agostino RB, Sr., Lumley T, Ehret GB, Heeringa J, Aspelund T, Newton-Cheh C, Larson MG, Marciante KD, Soliman EZ, Rivadeneira F, Wang TJ, Eiriksdottir G, Levy D, Psaty BM, Li M, Chamberlain AM, Hofman A, Vasan RS, Harris TB, Rotter JI, Kao WH, Agarwal SK, Stricker BH, Wang K, Launer LJ, Smith NL, Chakravarti A, Uitterlinden AG, Wolf PA, Sotoodehnia N, Kottgen A, van Duijn CM, Meitinger T, Mueller M, Perz S, Steinbeck G, Wichmann HE, Lunetta KL, Heckbert SR, Gudnason V, Alonso A, Kaab S, Ellinor PT, Witteman JC. Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat Genet.* 2009; 41:879-881.
- 15
- 20
- 25
8. Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano T, Matsushita T, Yamazaki K, Ohnishi Y, Saito S, Kitazono T, Ibayashi S, Sueishi K, Iida M, Nakamura Y, Kiyohara Y. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C ϵ) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet.* 2007; 39:212-217.
- 30
9. Yamada Y, Fuku N, Tanaka M, Aoyagi Y, Sawabe M, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Kato K, Watanabe S, Nozawa Y, Hasegawa A, Kojima T. Identification of CELSR1 as a
- 35

- susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study. *Atherosclerosis*. 2009; 207:144-9.
10. Domingues-Montanari S, Fernández-Cadenas I, Del Río-Espinola A, Mendioroz M, Fernandez-Morales J, Corbeto N, Delgado P, Ribó M, Rubiera M, Obach V, Martí-Fàbregas J, Freijo M, Serena J, Montaner J. KCNK17 genetic variants in ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2010; 208(1):203-9.
- 10 11. Hsieh K, Lalouschek W, Schillinger M, Endler G, Reisinger M, Janisiw M, Lang W, Cheng S, Wagner O, Mannhalter C. Impact of alphaENaC polymorphisms on the risk of ischemic cerebrovascular events: a multicenter case-control study. *Clin Chem*. 2005; 51(6):952-6.
- 15 12. Muñoz X, Sumoy L, Ramírez-Lorca R, Villar J, de Frutos PG, Sala N. Human vitamin K-dependent GAS6: gene structure, allelic variation, and association with stroke. *Hum Mutat*. 2004; 23(5):506-12.
- 20 13. Obach V, Revilla M, Vila N, Cervera A A, Chamorro A A. alpha(1)-antichymotrypsin polymorphism: a risk factor for hemorrhagic stroke in normotensive subjects. *Stroke*. 2001; 32(11):2588-91.
- 25 14. Liu J, Sun K, Bai Y, Zhang W, Wang X, Wang Y, Wang H, Chen J, Song X, Xin Y, Liu Z, Hui R. Association of three-gene interaction among MTHFR, ALOX5AP and NOTCH3 with thrombotic stroke: a multicenter case-control study. *Hum Genet*. 2009; 125(5-6):649-56.
- 30 15. Ludwig M, Bolkenius U, Wickert L, Marynen P, Bidlingmaier F. Structural organisation of the gene encoding the alpha-subunit of the human amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Hum Genet*. 1998; 102:576-581.
- 35 16. Rossier BC. 1996 Homer Smith Award Lecture. Cum grano salis: the epithelial sodium channel and the control of blood pressure. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8:980-992.

17. Corvol P, Persu A, Gimenez-Roqueplo AP, Jeunemaitre X. Seven lessons from two candidate genes in human essential hypertension: angiotensinogen and epithelial sodium channel. *Hypertension*. 1999; 33:1324-1331.
- 5 18. Tong Q, Menon AG, Stockand JD. Functional polymorphisms in the alpha-subunit of the human epithelial Na⁺ channel increase activity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290:F821-F827.
19. Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, Lo
10 EH. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med*. 2003; 9:1313-1317.
20. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín J.
15 Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. 2003; 107:598-603.
21. Lamblin N, Bauters C, Hermant X, Lablanche JM,
20 Helbecque N, Amouyel P. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40:43-48.
22. Zhang B, Dhillon S, Geary I, Howell WM, Iannotti F,
25 Day IN, Ye S. Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2001; 32:2198-2202.
23. Jormsjo S, Ye S, Moritz J, Walter DH, Dimmeler S,
30 Zeiher AM, Henney A, Hamsten A, Eriksson P. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res*. 2000; 86:998-1003.
24. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell
35 CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and

- characterization of human endothelial nitric oxide synthase. FEBS Lett. 1992; 307:287-293.
25. Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. J Biol Chem. 1996; 271:27237-27240.
- 5
26. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2006; 164:921-935.
- 10
27. Sironi L, Cimino M, Guerrini U, Calvio AM, Lodetti B, Asdente M, Balduini W, Paoletti R, Tremoli E. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23:322-327.
- 15
28. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. J Cereb Blood Flow Metab. 1996; 16:981-987.
- 20
29. Decher N, Maier M, Dittrich W, Gassenhuber J, Brüggemann A, Busch AE, Steinmeyer K. Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. FEBS Lett 2001; 492:84-9.
- 25
30. Girard C, Duprat F, Terrenoire C, Tinel N, Fosset M, Romey G, Lazdunski M, Lesage F. Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. Biochem Biophys Res Commun 2001; 282:249-56.
- 30
31. Niemeyer MI, Cid LP, Barros LF, Sepúlveda FV. Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K+ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. J Biol Chem 2001; 276:43166-74.
32. Barriere H, Belfodil R, Rubera I, Tauc M, Lesage F, Poujeol C, Guy N, Barhanin J, Poujeol P. Role of TASK2
- 35

potassium channels regarding volume regulation in primary cultures of mouse proximal tubules. *J Gen Physiol* 2003; 122:177-90.

33. Duprat F, Girard C, Jarretou G, Lazdunski M.
5 Pancreatic two P domain K⁺ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. *J Physiol* 2005; 562:235-44.
34. Niemeyer MI, González-Nilo FD, Zúñiga L, González W, Cid LP, Sepúlveda FV. Neutralization of a single
10 arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:666-71.
35. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological
15 advances. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(13):4181-93.
36. Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods Mol Biol.* 2009; 578:245-54.

REIVINDICACIONES

1.- Combinación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) que comprende rs2276109, rs10275136, rs310585, y rs5742912, indicativa del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular.

2.- La combinación según la reivindicación 1, donde dicha combinación de SNPs se combina con uno o más de los SNPs rs7956957, rs10947803, rs405509, rs4934, rs2720723, rs2295778, rs7193343, rs6007897, rs4044210 y rs2200733.

3.- La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha combinación de polimorfismos de nucleótido único se combina con una o más variables clínicas asociadas con una enfermedad neurovascular.

4.- La combinación según la reivindicación 3, donde dicha variable clínica se selecciona entre edad, sexo, tabaquismo, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

5.- Combinación de polinucleótidos aislados incluidos en genes asociados a enfermedades neurovasculares que comprenden cada uno de dichos polinucleótidos un SNP de la combinación de SNPs que comprende rs2276109, rs10275136, rs310585, y rs5742912, indicativa del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular, correspondiendo dichos polinucleótidos aislados a las SEC ID N ° 1, 2, 3 y 6, respectivamente.

6.- La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que los alelos de dichos SNPs se deducen mediante pruebas genéticas o midiendo los niveles de actividad o concentración de las proteínas, o los correspondientes niveles de expresión de ARN de NOS3, SCNN1A, KCNK17, MMP12 o LRP.

7.- La combinación según la reivindicación 5 en la que los alelos de dichos SNPs se deducen mediante pruebas genéticas o midiendo los niveles de actividad o concentración de las proteínas, o los correspondientes

niveles de expresión de ARN de NOS3, SCNN1A, KCNK17, MMP12 o LRP.

8.- La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ó 6, donde la enfermedad 5 neurovascular es el ictus.

9.- La combinación según la reivindicación 5 ó 7, donde la enfermedad neurovascular es el ictus.

10.- Un método para la determinación de una predisposición genética a las enfermedades neurovasculares 10 de un individuo, que comprende la detección de los alelos de la combinación de SNPs que comprende rs2276109, rs10275136, rs310585, y rs5742912 en una muestra de ácido nucleico aislado de un individuo.

11.- El método según la reivindicación 10, donde se 15 detectan un alelo A para rs310585, un alelo G para rs2276109, un alelo C para rs10275136, o un alelo T para rs5742912.

12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la muestra de ácido 20 nucleico comprende ADN.

13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde la muestra de ácido nucleico comprende ARN.

14.- El método según cualquiera de las 25 reivindicaciones 10-13, donde dichos SNPs se detectan por hibridación de una sonda de ácido nucleico o secuencia de oligonucleótido, o mediante marcadores radiactivos, enzimáticos, luminosos o fluorescentes.

15.- El método según cualquiera de las 30 reivindicaciones 10-14, donde dicha combinación de SNPs se combina con una o más variables clínicas asociadas con enfermedades neurovasculares.

16.- El método según la reivindicación 15, donde 35 dichas variables clínicas se seleccionan entre edad, sexo, tabaquismo, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

17.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, donde dicha combinación de SNPs se combina con uno o más de los SNPs rs7956957, rs10947803, rs405509, rs4934, rs2720723, rs2295778, 5 rs7193343, rs6007897, rs4044210 y rs2200733.

18.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que los alelos de dichos SNPs se deducen mediante pruebas genéticas o midiendo los niveles de actividad o concentración de las proteínas, o 10 los correspondientes niveles de expresión de ARN de NOS3, SCNN1A, KCNK17, MMP12 y/o LRP.

19.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, que comprende además la comparación de la combinación de alelos obtenida para un 15 individuo con la combinación de alelos obtenida para otro individuo afectado por una enfermedad neurovascular y la detección de la predisposición genética a una enfermedad neurovascular si el individuo a ser analizado presenta la misma carga genética que el individuo afectado

20 20.- El método según la reivindicación 19, donde el otro individuo tiene una relación familiar con el individuo a analizar.

21.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20, donde dicha enfermedad 25 neurovascular es el ictus.

22.- Un kit para determinar el riesgo de un individuo de sufrir dicha enfermedad neurovascular que comprende, (a) Sondas que permiten detectar los alelos de la combinación de SNPs que comprende rs2276109, rs10275136, 30 rs310585, y rs5742912.

(b) Instrucciones para usar el kit y determinar el riesgo del individuo de sufrir una enfermedad neurovascular teniendo en cuenta la combinación de SNPs presentada.

23.- El kit según la reivindicación 22, donde una o 35 más sondas están marcadas.

24.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, que incluye un reactivo para detectar el marcador.

5 25.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde dicha combinación de SNPs se combina con variables clínicas asociadas con una enfermedad neurovascular.

10 26.- El kit según la reivindicación 25, donde las variables clínicas se seleccionan entre edad, sexo, tabaquismo, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

27.- El kit según las reivindicaciones 22 a 26, donde dicha combinación de SNPs se combina con uno o más de los SNPs rs7956957, rs10947803, rs405509, rs4934, rs2720723, rs2295778, rs7193343, rs6007897, rs4044210 y rs2200733.

15 28.- El kit según las reivindicaciones 22 a 27, donde los alelos de dichos SNPs se deducen mediante pruebas genéticas o midiendo los niveles de actividad o concentración de las proteínas, o los correspondientes niveles de expresión de ARN de NOS3, SCNN1A, KCNK17, MMP12
20 y/o LRP.

29.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, donde dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

25 30.- El uso de la combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un kit para determinar el riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular.

31.- El uso de la combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, como herramienta de prueba genética para enfermedades neurovasculares.

30 32.- El uso según las reivindicaciones 30 ó 31, donde dicha enfermedad neurovascular es el ictus.

33.- La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho individuo pertenece a la población mediterránea.

35 34.- La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho individuo pertenece a

la población española.

35.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21, donde dicho individuo pertenece a la población mediterránea.

5 36.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21, donde dicho individuo pertenece a la población española.

10 37.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, donde dicho individuo pertenece a la población mediterránea.

38.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, donde dicho individuo pertenece a la población española.

15 39.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, donde dicho individuo pertenece a la población mediterránea.

40.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, donde dicho individuo pertenece a la población española.

Figura 1

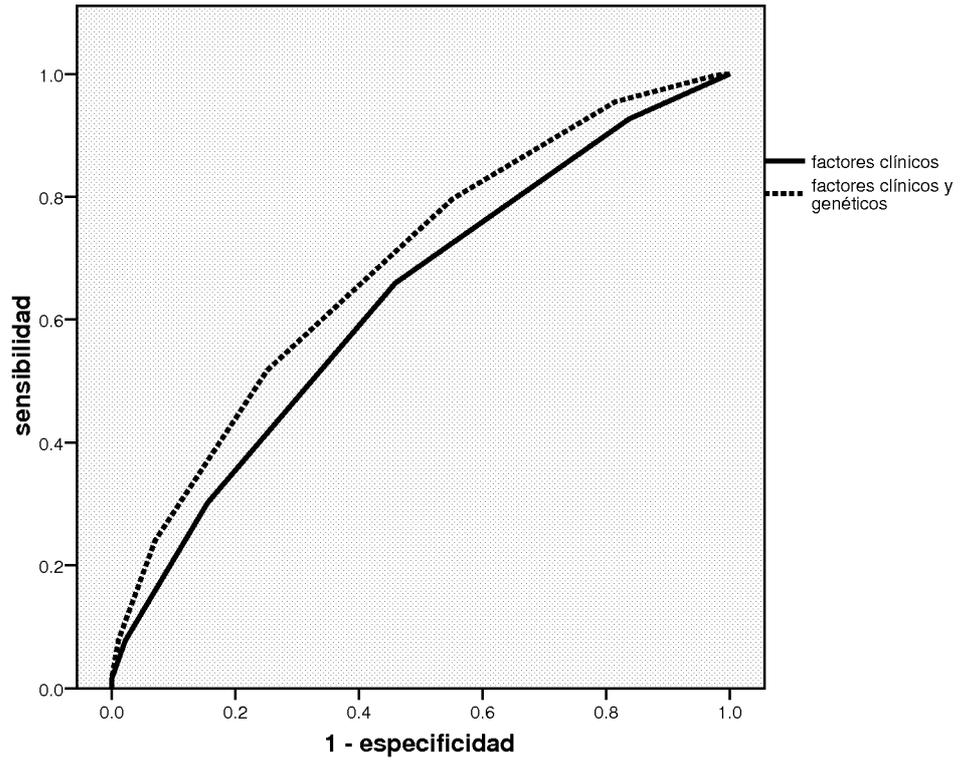


Figura 2

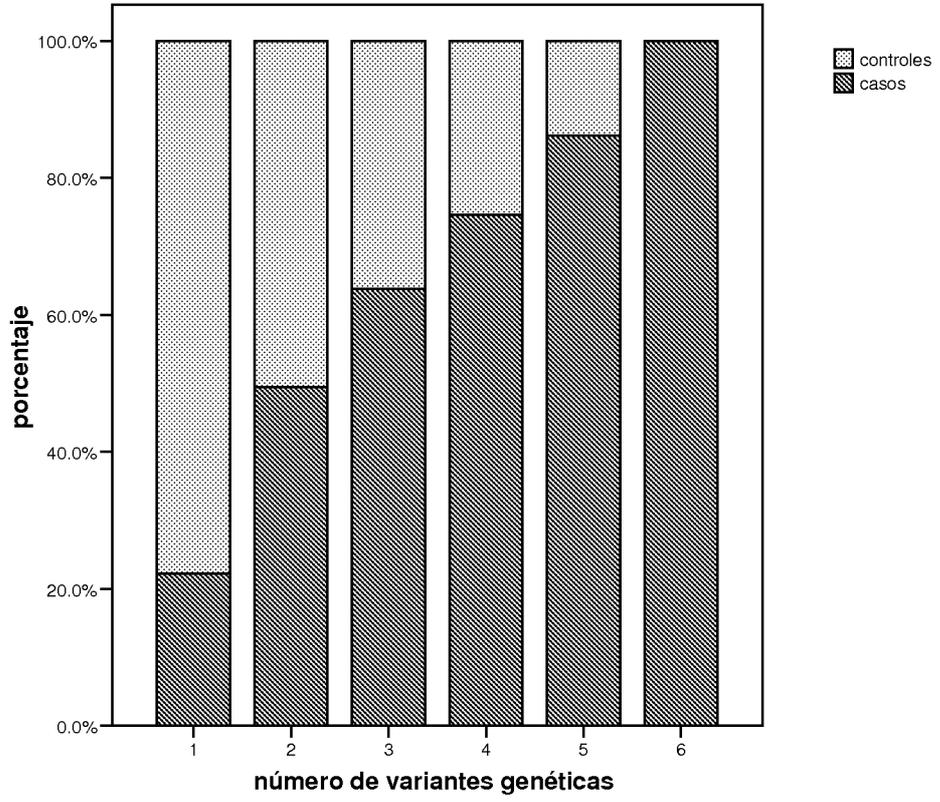


Figura 3

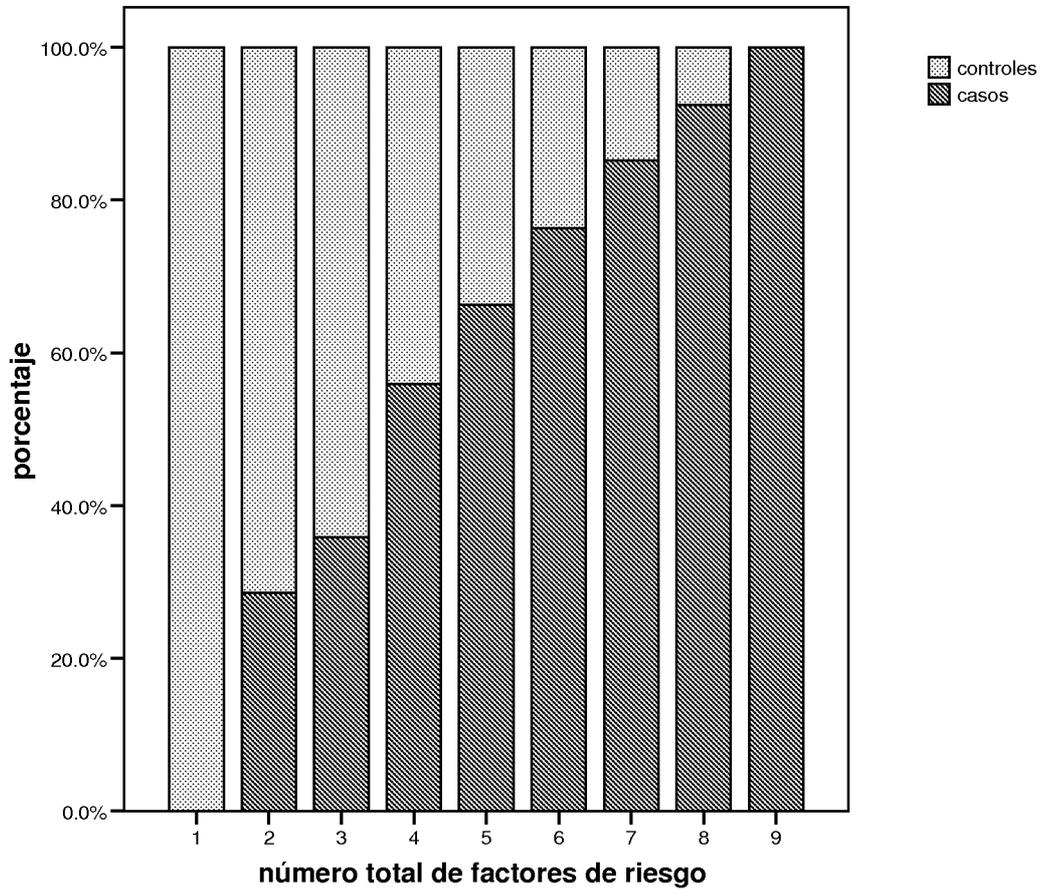


Figura 4

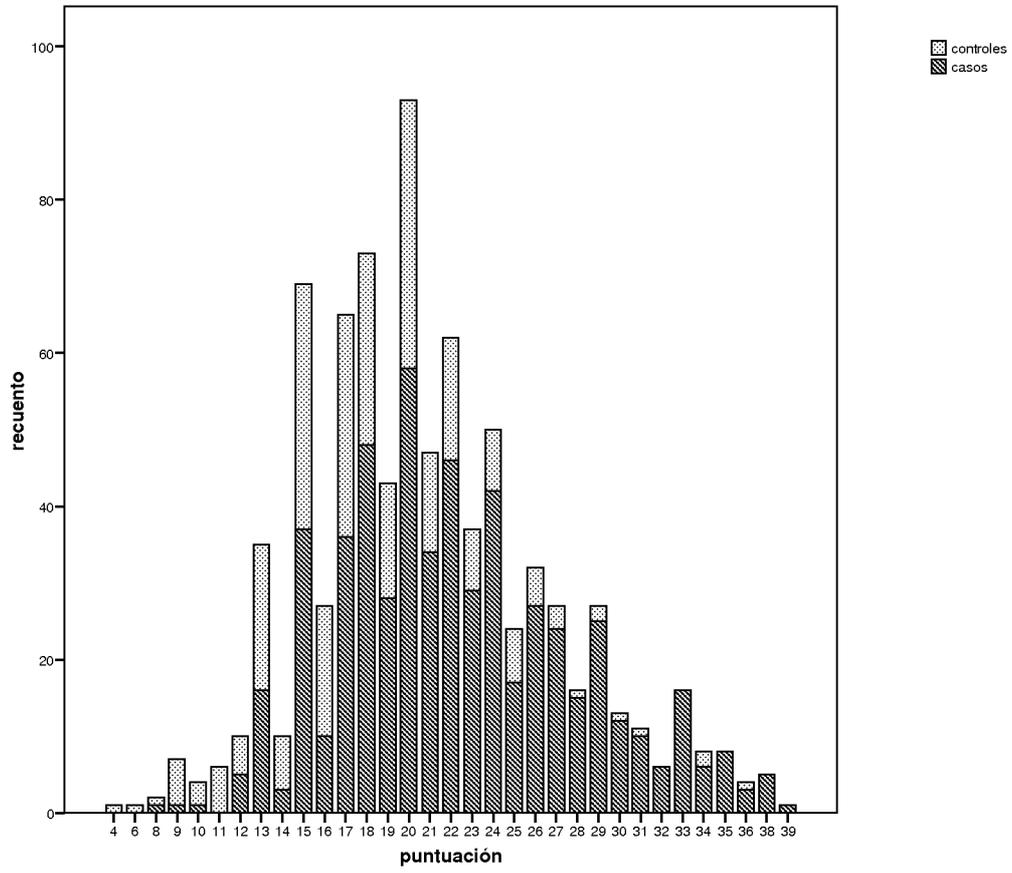
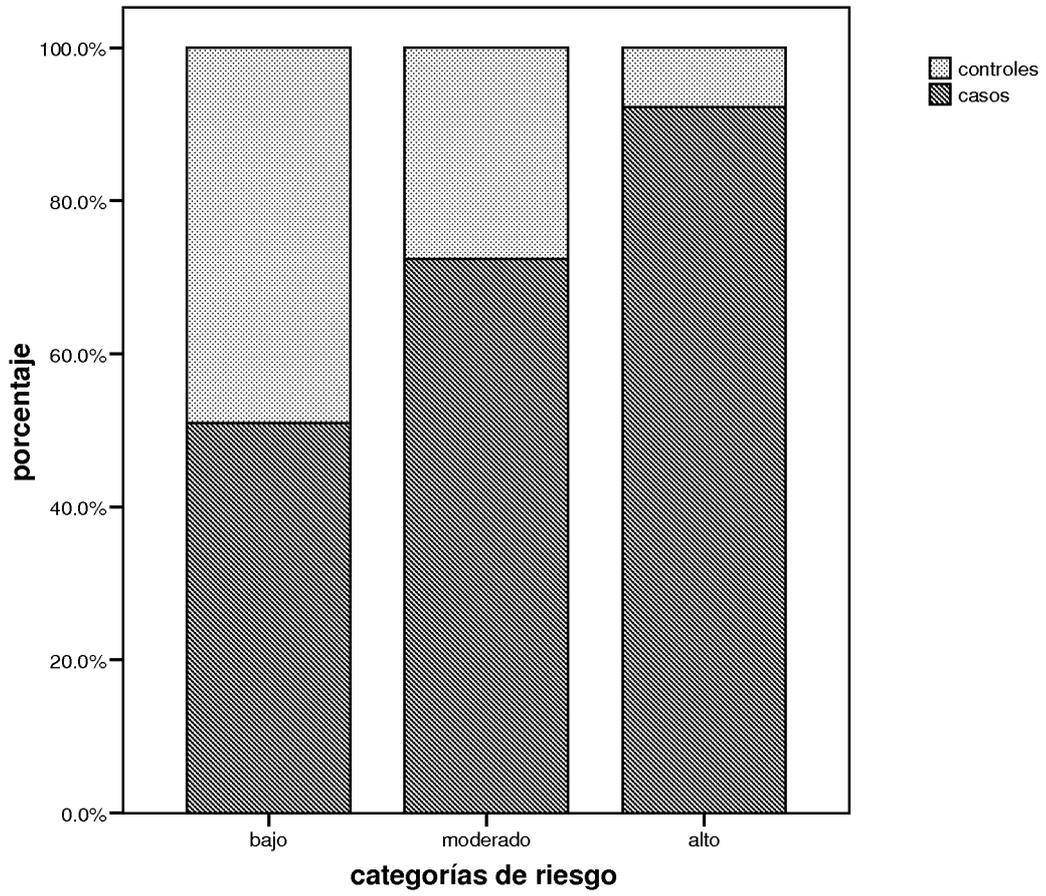


Figura 5



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

<120> COMBINACIÓN DE SNPS PARA DETERMINAR EL RIESGO DE SUFRIR UNA ENFERMEDAD NEUROVASCULAR

<130> P25337ES00

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> Variation
 <222> (21)..(21)
 <223> n = a or g

<400> 1
 atcaagggat gatatcaact ntgagtcact cataggattc a 41

<210> 2
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> variation
 <222> (21)..(21)
 <223> n = t or c

<400> 2
 actgagagcc cccagtgccc nggcccgtac tcagagcacg g 41

<210> 3
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> variation
 <222> (21)..(21)
 <223> n = g or a

<400> 3
 ctccccatcc atccatccac ncatctacc acccttctac c 41

<210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
<221> variation
<222> (21)..(21)
<223> n = c or g

<400> 4
ggaggcagtt ctttccaccc ngagcctggg ttggggaggc c 41

<210> 5
<211> 41
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> variation
<222> (21)..(21)
<223> n = c or a

<400> 5
ctcccaggat gaggagatc nagaaggggg cagtgtgagg c 41

<210> 6
<211> 41
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> variation
<222> (21)..(21)
<223> n = c or t

<400> 6
tctctgctgg ttactcacga nggccctcgg tgacatccca g 41



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031004

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOMINGUES-MONTANARI S .e t a l. "KCNK17 genetic variants in i schemic st roke." Atherosclerosis, e lsevie4r Ireland LT D, I E (01.01.2010) V ol. 208, p ages 203-209.Todo el documento.	1-40
A	WO 2007/086980 A2 (DUKE UNIVERSITY) 02.08.2007, Todo el documento.	1-40
A	WO 2008/075977 A2 (SYNERGENZ BIOSCIENCE LIMITED) 26.06.2008, Todo el documento.	1-40

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
31.08.2012

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

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, TXTE, TXTF, XPESP, NOL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-40	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-40	SI
	Reivindicaciones	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 se publica.

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	DOMINGUES-MONTANARI S. et al. "KCNK17 genetic variants in ischemic stroke." <i>Atherosclerosis</i> , Elsevier Ireland LTD, IE (01.01.2010) Vol. 208, pages 203-209. Todo el documento.	01.01.2010
D02	WO 2007/086980 A2 (DUKE UNIVERSITY)	02.08.2007
D03	WO 2008/075977 A2 (SYNERGENZ BIOSCIENCE LIMITED)	26.06.2008

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 de invención consiste en una combinación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) que comprende rs2276109, rs10275136, rs310585 y rs5742912, indicativa del riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular (reivindicaciones 1-9, 33-34), un método para la determinación de una predisposición genética a las enfermedades neurovasculares de un individuo, que comprende la detección de los alelos de la combinación de SNPs mencionada anteriormente (reivindicaciones 10-21, 35-36), el kit para realizar dicho método (reivindicaciones 22-29, 37-38), y el uso de la combinación anterior en un kit para determinar el riesgo de un individuo de sufrir una enfermedad neurovascular o como herramienta de prueba genética para enfermedades neurovasculares (reivindicación 30-32, 39-40).

El documento D01 divulga un estudio de análisis de 12 SNPs en una población blanca que comprende pacientes con ictus isquémico y controles sanos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga determinados polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en el genoma humano asociados con enfermedades vasculares, en particular la estenosis coronaria (ver todo el documento).

El documento D03 divulga métodos para la evaluación de trastornos vasculares, en particular, para el diagnóstico de la enfermedad coronaria y el síndrome coronario agudo (ACS) mediante el análisis de polimorfismos genéticos y la expresión de los genes alterados (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986)

Ninguno de los documentos D01-D03 divulga una combinación de los polimorfismos reivindicados en la presente solicitud de invención. Así, la invención reivindicada implica un efecto mejorado comparado con el estado de la técnica. Además, no se considera obvio que un experto en la materia obtenga la invención a partir de los documentos mencionados anteriormente.

Por tanto, las reivindicaciones 1-40 se consideran nuevas y no implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.