

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 075**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11170235 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2535424**

54 Título: **SNP asociados a enfermedad tromboembólica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.10.2015**

73 Titular/es:

**GENDIAG.EXE, S.L. (100.0%)  
Joan XXIII, 10  
08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona), ES**

72 Inventor/es:

**SALAS, EDUARDO;  
SORIA, JOSÉ MANUEL;  
OGORELKOVA, MIROSLAVA;  
ELOSUA, ROBERTO;  
VILA, JOAN S. y  
CASTILLO, SERGIO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 547 075 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

SNP asociados a enfermedad tromboembólica

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades o trastornos tromboembólicos. Más específicamente, se refiere a marcadores y procedimientos para determinar si un sujeto, particularmente un sujeto humano, está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno tromboembólico, desarrollar un evento tromboembólico, padecer una enfermedad o trastorno tromboembólico o experimentar una complicación de una enfermedad tromboembólica.

## ANTECEDENTES TÉCNICOS

La enfermedad tromboembólica es la causa principal de morbilidad y mortalidad en el mundo desarrollado (America Heart Association 2010. Circulation 2010; 121: e46-e215). La trombosis arterial es la causa subyacente más común de infarto de miocardio agudo, accidentes cerebrovasculares no hemorrágicos y enfermedad vascular periférica. Las manifestaciones patológicas de tromboembolia venosa (TEV) incluyen en gran medida trombosis venosa profunda (TVP) y embolia pulmonar (EP). Aunque los eventos tromboembólicos arteriales son la causa principal de muerte e incapacidad, la enfermedad venosa desempeña también un papel importante. La TEV tiene lugar por primera vez en 100 de cada 100.000 personas cada año en los Estados Unidos (America Heart Association 2010. Circulation 2010:121:e46-e215). Aproximadamente un tercio de los pacientes con TEV sintomática manifiestan EP, mientras que dos tercios manifiestan TEV sola (America Heart Association 2010. Circulation 2010; 121: e46-e215). Aproximadamente un tercio de los pacientes con TEV sintomática manifiesta EP, mientras que dos tercios manifiestan TEV sola (America Heart Association 2010. Circulation 2010; 121: e46-e215). La EP es la causa más común de muerte hospitalaria prevenible, que da cuenta de 60.000 muertes anualmente en Estados Unidos (Anderson FA. Arch. Intern. Med. 1991; 151: 933-8, Spencer FA. Arch. Inter. Med. 168: 425-430).

Los libros de texto médicos y los estudios epidemiológicos consideran característicamente a la enfermedad tromboembólica arterial y venosa como entidades distintas, cada una con su propia base fisiopatológica, factores de riesgo únicos y distintos regímenes terapéuticos (Bauer KA. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2002; 353-368). Los coágulos arteriales tienen lugar típicamente en un vaso dañado y la causa más común de daño vascular en el sistema arterial es la enfermedad vascular aterosclerótica (EVA) (Lane DE 2000. Thromb. Haemost. 2000; 76: 651-62). Los factores de riesgo de trombosis arterial se consideran por lo tanto los mismos que aquellos para EVA. Los coágulos arteriales tienen lugar en un entorno de alto flujo y alta cizalladura y estos coágulos, también llamados coágulos blancos, son ricos en plaquetas. La prevención y tratamiento de la trombosis arterial está a menudo dirigida a la inhibición de plaquetas. Aunque el daño vascular puede promover la formación de coágulos venosos, los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de coágulos venosos son estasis y cambios en la composición sanguínea (trombofilia) (Lane DE 2000. Thromb. Haemost. 2000; 76: 651-62). Los coágulos venosos tienen lugar en un sistema de bajo flujo, son ricos en fibrina que se enmaraña con los eritrocitos y se hace referencia a ellos como coágulos rojos. La inhibición de la formación de fibrina es el pilar de la prevención y el tratamiento de la trombosis venosa. A menudo se reseña que los factores de riesgo para trombosis arterial y venosa difieren en gran medida (Bauer KA. Hematology Am. Soc. Hemato. Educ. Program 2002; 353-368).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado una estrecha asociación entre trombosis arterial y venosa a una variedad de niveles. Específicamente, se ha mostrado que:

- 1) la trombosis arterial y venosa comparten factores de riesgo comunes (Doggen CJM Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004; 24: 1970-5., Goldhaber SZ en: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. "Hemostasis and Thrombosis". Nueva York: Churchill and Livingstone: 1997; 1327-1333),
- 2) Los individuos que padecen tromboembolia venosa idiopática tienen un riesgo notablemente aumentado de padecer un evento cardiovascular significativo (Becattini C. European Heart Journal 2005; 26: 77-83),
- 3) los individuos que padecen tromboembolia venosa idiopática tienen una incidencia aumentada de enfermedad vascular aterosclerótica (Becattini C. European Heart Journal 2005; 26: 77-83.) y
- 4) aquellos que padecen tromboembolia venosa idiopática tienen una incidencia significativamente mayor de síndrome metabólico (Ageno W. J. Thromb. Haemost. 2006; 4: 1914-8).

Los factores de riesgo que se han reseñado como comunes a ambas trombosis arterial y venosa y que representan un peligro significativo para el desarrollo de cada entidad incluyen aumento de peso y edad, tabaquismo, exposición a estrógenos y presencia de diabetes. Se ha mostrado también que los niveles altos de colesterol HDL están asociados a un riesgo reducido de trombosis venosa, mientras que los niveles elevados de triglicéridos y/o colesterol total expresan un riesgo aumentado. Otros factores de riesgo que se ha reseñado que son comunes tanto a trombosis arterial como venosa incluyen la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, disfibrinogenemia, hiperhomocisteinemia y niveles elevados de fibrinógeno, lipoproteína (a) y factor VIII.

Una de las evidencias más sólidas a favor de un nexo entre trombosis arterial y venosa es el estudio de análisis genético de la trombofilia idiopática (GAIT) (Souto JC. Am. J. Hum. Genet. 2000; 67: 1452-1459). Este estudio

basado en familias de la genética de la trombosis en una población española se inició para determinar la heredabilidad de la trombosis. Se evaluaron 328 individuos en 21 linajes extendidos usando una adaptación informatizada novedosa de un modelo de umbral multivariante. Los autores concluyeron que más de un 60 % de la variación en la propensión a trombosis común es atribuible a factores genéticos. Lo que hace a este estudio inusual es que se incluyeron en el análisis tanto eventos tromboembólicos venosos como arteriales. Cuando se analizaron conjuntamente las trombosis venosa y arterial, las trombosis arterial y venosa estaban altamente relacionadas genéticamente. Es decir, muchos de los mismos genes están implicados en la patogénesis de la enfermedad arterial y venosa.

Existen también estudios (Doggen CJM, Smith NL, Lamahre RN, *et al.* Arteros Thromb. Vasc. Biol. 2004; 24: 1970-5; Becattini E. European Heart Journal 2005; 26: 77-83; Ageno W. J. Thromb. Haemost. 4: 1914-8) que sugieren que las trombosis arterial y venosa representan diferentes manifestaciones de la misma enfermedad y que el proceso subyacente está impulsado por un conjunto común de genes.

#### 15 **A) Prevención del primer episodio de tromboembolia**

La trombosis sintomática (arterial o venosa) es una enfermedad multifactorial que se manifiesta cuando una persona con predisposición subyacente a trombosis (trombofilia, a la que se hace referencia también como trastorno trombofílico o síndromes hipercoagulables) se expone a factores de riesgo clínicos.

La valoración de la presencia de trombofilia no está limitada únicamente a los análisis de laboratorio, sino que empieza con un historial detallado y un examen físico. La indagación detallada de los síntomas y signos de factores de riesgo adquiridos (enfermedades coexistentes, exposición a medicación y circunstancias clínicas) que están asociadas a la trombosis son una parte importante de la evaluación inicial, así como un examen físico completo. Además de un análisis de laboratorio acertado apropiado para la edad y síntomas del paciente, la confirmación objetiva de tromboembolia venosa es crítica.

#### **Análisis de laboratorio**

Actualmente, no hay un solo ensayo de laboratorio global que "cribe" la presencia de trombofilia. Por tanto, los análisis de laboratorio pueden clasificarse ampliamente como (1) análisis de laboratorio generales, (2) análisis de coagulación especializados y (3) análisis auxiliares para trastornos conocidos por predisponer a trastornos trombóticos.

#### 35 **Análisis de coagulación especializados**

El análisis de coagulación especial consiste en una batería de ensayos de trombofilia complejos (basados en proteína y ADN) para detectar la presencia de una trombofilia heredada o adquirida. Sin embargo, múltiples afecciones preanalíticas afectan a los resultados de los ensayos no basados en ADN (p.ej. anticoagulantes, trombosis aguda, enfermedad hepática, etc.), de modo que la interpretación de los resultados tiene que hacerse dentro del contexto de las circunstancias que rodean el análisis. Un factor adicional que afecta al rendimiento del análisis es el origen étnico de la población de pacientes que se está estudiando. La prevalencia del factor V Leiden (FVL) varía de 3 a 7 % en los blancos de ascendencia europea, pero tiene una prevalencia muy baja en individuos de otros grupos étnicos: 0 % entre los nativos americanos/australianos y africanos, 0,16 % entre los chinos y 0,6 % entre los individuos de Asia menor (India, Paquistán, Sri Lanka). El origen étnico es importante especialmente cuando se analizan pocos (uno o dos) marcadores genéticos.

#### **Factores que afectan a los resultados de análisis de coagulación especializados basados en proteína**

##### 50 Efecto de la trombosis aguda

Durante un episodio trombótico agudo, los niveles de antitrombina, proteína C y proteína S pueden reducirse transitoriamente; por tanto, si no se repite el ensayo alejado del evento trombótico y de la terapia anticoagulante, el paciente puede diagnosticarse erróneamente que tiene una deficiencia congénita.

##### 55 Efecto de los anticoagulantes

- Heparina. La terapia con heparina puede reducir engañosamente los niveles de antitrombina. Aunque la mayoría de reactivos anticoagulantes de lupus (ACL) [p.ej. tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRD) y TTPA de Stadot] contienen neutralizantes de heparina que pueden neutralizar hasta 1 U/ml de heparina, la presencia de heparina en exceso puede dar como resultado un resultado de prueba falso positivo, que afecta a la duración de la profilaxis secundaria. Por tanto, los resultados positivos del ensayo de LAC efectuados con heparina deberían reconfirmarse cuando el paciente deje la heparina.
- Terapia de antagonista de vitamina K (AVK). Los niveles de proteína C y S se reducen por la terapia de AVK (p.ej. la warfarina, puesto que son proteínas dependientes de la vitamina K). Además, la terapia de

AVK puede dar como resultado un ACL falso positivo con ciertos ensayos (p.ej. TVVRD).

- Inhibidores directos de la trombina (IDT, por ejemplo argatrobán, lepirudina, bivalirudina). Debido a que la mayoría de los ensayos de actividad anticoagulante se basan en la generación de trombina para conseguir un criterio de valoración de detección de puntos, la presencia de IDT interfiere con este criterio de valoración y retarda la formación de puntos. Esto puede conducir a un ACL falso positivo o a niveles de proteína C y S reducidas engañosamente. Los resultados de los ensayos cromogénicos son probablemente fiables.

#### Efecto de enfermedad hepática

La mayoría de proteínas anticoagulantes y procoagulantes se producen en el hígado. En enfermedad hepática avanzada, se reducen los niveles tanto de proteínas anticoagulantes como procoagulantes.

#### Problemas de recogida y procesamiento de muestras

En la práctica, los médicos ordenantes tienen un impacto limitado sobre la recogida y procesamiento de especímenes; sin embargo, el conocimiento de dichos efectos puede conducir a considerar repetir el análisis si los datos son inesperados o no se ajustan al patrón esperado [p.ej. cociente de resistencia a proteína C activada (RPCA) reducido que sugiere la presencia de RPCA, aunque la prueba de FVL es negativa].

- Efecto del tipo de anticoagulante en el tubo de recogida de especímenes

Los tubos de recogida de especímenes estándares contienen 0,105-0,109 mol de citrato para resultados óptimos. Los especímenes pueden recogerse inadvertidamente con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lo que daría como resultado niveles de proteína engañosamente reducidos y un cociente de RPCA reducido.

- Efecto del procesamiento de especímenes

Los especímenes deberían centrifugarse dos veces lo antes posible después de la recogida para reducir la cantidad de plaquetas residuales al mínimo. La presencia de plaquetas residuales puede dar como resultado una prueba falsa negativa en ACL.

#### **Riesgo molecular de enfermedad trombótica**

Aunque la tendencia heredada a hemorragia excesiva se atribuye a menudo a una o pocas anomalías genéticas, existe una amplia evidencia que sugiere que, en contraposición, las manifestaciones clínicas de hipercoagulabilidad son habitualmente el resultado de interacciones adversas entre múltiples genes y el entorno. Por tanto, el uso de diagnósticos moleculares para documentar marcadores de riesgo trombótico (trombofilia) probará ser mucho más arduo que con los trastornos hemorrágicos heredados. Para complicar adicionalmente el tema, a pesar del hecho de que con análisis apropiados puedan identificarse las mutaciones en pacientes después de un primer episodio clínico de tromboembolia venosa, la interpretación de estos resultados sigue siendo problemática.

#### **Resistencia heredada a proteína C activada: factor V Leiden**

Hasta 1994, la investigación de pacientes con evidencias clínicas de hipercoagulabilidad era habitualmente improductiva. Sin embargo, con el descubrimiento por Dahlback y Hildebrand de una forma heredada de resistencia a los efectos proteolíticos de la proteína C activada, y el posterior hallazgo de una mutación de aminoácido común en el gen del factor V por Bertina y colaboradores en Leiden, se hizo un gran avance en la valoración de laboratorio del riesgo trombótico.

La mutación de Leiden sustituye una arginina por una glutamina en el residuo aminoacídico 506 del factor V, el sitio de escisión inicial para proteína C activada. La mutación se detecta fácilmente mediante una serie de enfoques basados en PCR. Se ha documentado que entre un 2 y un 5 % de los individuos de las poblaciones occidentales son heterocigóticos del factor V Leiden. En contraposición, la mutación es extremadamente rara en sujetos de ascendencia asiática y africana.

En algunos laboratorios, se efectúa el cribado inicial de resistencia a proteína C activada usando la prolongación del ensayo basado en el tiempo de tromboplastina parcial activada como indicador; los pacientes de análisis positivo (prolongación en presencia de plasma deficiente en factor V) se evalúan posteriormente por PCR.

Cada vez más, cuando el acceso a análisis molecular basado en PCR es rutinario, los laboratorios elegirán más a menudo proceder directamente a la prueba genética, ya que el resultado es definitivo y más del 95 % de la resistencia a proteína C activada es el resultado de esta única mutación.

Las personas heterocigóticas de la mutación del factor V Leiden tienen un riesgo relativo de trombosis venosa aumentado aproximadamente 5 veces. Se encuentra en un 15-20 % de los pacientes que experimentan su primer

episodio de trombosis venosa. El fenotipo hipercoagulable asociado al factor V Leiden muestra una penetración incompleta, y algunos individuos pueden no manifestar nunca un evento trombotico clínico. En contraposición con el riesgo relativo elevado de un evento trombotico venoso inicial asociado a factor V Leiden, esta variante genética no está asociada a riesgos aumentados de trombosis arterial ni a la recurrencia de trombosis venosa. La co-herencia de otros factores de riesgo trombotico heredados o la exposición a factores de riesgo ambientales puede potenciar drásticamente el riesgo trombotico en portadores del factor V Leiden. Muchos médicos analizan este trastorno en pacientes con un historial familiar de trombosis que se vayan a exponer a un factor de riesgo trombotico adquirido. Los individuos homocigóticos de la mutación tienen un riesgo relativo de trombosis venosa potenciado 70 veces, indicando que este fenotipo se transmite como un rasgo codominante.

#### **Variante de secuencia 3' no codificante 20210 de protrombina**

En 1996, Poort y colaboradores describieron una asociación entre el polimorfismo nucleotídico G a A en posición 20210 de la región 3' no traducida (UTR) del gen de protrombina, niveles plasmáticos elevados de protrombina y un riesgo potenciado de trombosis venosa. Esta sustitución nucleotídica polimórfica está en el mismo extremo de 3' UTR y ejerce su efecto sobre los niveles de protrombina en estado heterocigótico. Aunque los niveles plasmáticos de protrombina en sujetos heterocigóticos de este polimorfismo son mayores de media que en aquellos individuos con un genotipo de protrombina normal, los niveles siguen habitualmente dentro del intervalo normal. Como consecuencia, este polimorfismo puede evaluarse solo por análisis genético, que se consigue mediante un ensayo basado en PCR, implicando ahora lo más a menudo una forma de ensayo cuantitativo instantáneo.

Como con el genotipo de factor V Leiden, la prevalencia de la variante G a A 20210 de protrombina en la población general es relativamente alta con 1-5 %. Esta variante es también rara en personas de ascendencia asiática y africana. El estado heterocigótico está asociado a un aumento de 2 a 4 veces del riesgo relativo de trombosis venosa. No existe influencia sobre la recurrencia trombotica venosa. La relación de la G2010A de protrombina con la trombosis arterial es muy discreta (CP 1,32; IC del 95 % 1,03-1,69) (Kim RJ. *Am. Heart. J.* 2003; 146: 948-957).

#### **Variante de 5,10-metileno-tetrahidrofolato reductasa C671T termolábil**

La tercera variante genética de alta prevalencia que se creyó inicialmente que estaba asociada a un riesgo trombotico elevado es la variante C a T en el nucleótido 677 (una sustitución de alanina por valina) en el gen de 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Este genotipo es el resultado de la expresión de una enzima con termolabilidad aumentada. La homocigosis de la variante está asociada a hiperhomocisteinemia, particularmente en presencia de deficiencia en folato. En muchas poblaciones (europeos meridionales e hispanoamericanos), aproximadamente un 10 % de los sujetos son homocigóticos de la variante C677T, un cambio de secuencia que puede detectarse fácilmente mediante una estrategia basada en PCR. Sin embargo, después de análisis extendidos adicionales, en contraposición con las variantes de factor V Leiden y 20210 de protrombina, el papel del polimorfismo C677T de MTHFR como factor de riesgo independiente para tromboembolia venosa parece menor.

#### **B) Diagnóstico de tromboembolia venosa**

El análisis objetivo de la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar es esencial porque la valoración clínica sola no es fiable. El fracaso en diagnosticar tromboembolia venosa está asociado a una alta mortalidad, mientras que la anticoagulación inapropiada puede conducir a complicaciones graves, incluyendo hemorragia mortal.

#### **Diagnóstico de trombosis venosa profunda**

Los rasgos clínicos de la trombosis venosa profunda incluyen hinchazón localizada, eritema, dolor con la palpación y edema distal. Sin embargo, estos rasgos son no específicos, y aproximadamente un 85 % de los pacientes ambulatorios con sospecha de trombosis venosa profunda tendrán otra causa para sus síntomas. El diagnóstico diferencial de trombosis venosa profunda incluye

- celulitis;
- quiste de Baker roto;
- desgarro muscular, calambres musculares, hematoma muscular;
- compresión venosa externa;
- tromboflebitis superficial; y
- síndrome posttrombotico.

#### **Venografía**

La venografía es la prueba de referencia estándar para el diagnóstico de trombosis venosa profunda. Tiene la ventaja frente a otras pruebas de que puede detectar tanto trombosis venosa proximal como trombosis venosa de la pantorrilla aislada. Sin embargo, las desventajas son que:

- es invasiva, cara y requiere experiencia en la materia; y

- expone al paciente a los riesgos asociados a los medios de contraste, incluyendo el potencial de reacción alérgica o disfunción renal.

5 Por estas razones, las pruebas no invasivas tales como ultrasonografía venosa y análisis de dímeros D, solas o en combinación con valoración clínica, han reemplazado en gran medida a la venografía.

### Ultrasonografía venosa por compresión

10 Este es el procedimiento no invasivo de elección para diagnosticar TVP. Se toman imágenes de la vena femoral común, vena femoral superficial, vena poplítea y venas profundas proximales de la pantorrilla instantáneamente y se comprimen con la sonda transductora. La incapacidad de comprimir la vena totalmente es diagnóstico de trombosis venosa. La ultrasonografía venosa es altamente exacta para la detección de trombosis venosa proximal con una sensibilidad de aproximadamente un 97 %, una especificidad de aproximadamente un 94 % y un valor predictivo negativo de aproximadamente un 98 % en pacientes sintomáticos. Si la TVP no puede excluirse por un ultrasonido venoso proximal en combinación con otros resultados (p.ej. baja probabilidad clínica de dímero D normal), se efectúa un ultrasonido de seguimiento después de 1 semana para comprobar la extensión de la trombosis de la vena de la pantorrilla (presente en aproximadamente un 2 % de los pacientes). Si el segundo ultrasonido es normal, el riesgo de TEV sintomática durante los siguientes 6 meses es menor del 2 %.

20 La exactitud de la ultrasonografía venosa es sustancialmente menor si sus hallazgos son disconformes con la valoración clínica y/o si las anomalías están limitadas a segmentos cortos de las venas profundas. Idealmente, estos pacientes deberían hacerse un venograma porque el resultado del venograma diferirá del ultrasonido venoso en aproximadamente un 25 % de estos casos. Si no está disponible una venografía, pueden ayudar a aclarar el diagnóstico análisis adicionales (p.ej. dímero D, ultrasonografía venosa en serie) y evitar una terapia anticoagulante inapropiada.

30 La ultrasonografía venosa de las venas de la pantorrilla es más difícil de efectuar (p.ej. sensibilidad del 70 %) y su valor es controvertido. Algunos investigadores han propuesto que debería usarse un solo ultrasonido de compresión completa que incluya el examen de las venas de la pantorrilla para excluir la TVP. Los estudios que usan este procedimiento han reseñado una incidencia de TEV de un 0,5 % durante los 3 meses de seguimiento después de un examen negativo, estableciendo que un ultrasonido venoso negativo que incluya las venas de la pantorrilla excluye la TEV [8]. Sin embargo, este procedimiento tiene el potencial de diagnosticar la TVP de pantorrilla que se habría lisado espontáneamente sin tratamiento procurando resultados falsos positivos, exponiendo así a los pacientes al riesgo de hemorragia debida a la terapia anticoagulante sin un beneficio claro.

### 35 Análisis sanguíneos de dímero D

40 El dímero D se forma cuando se degrada la fibrina reticulada por plasmina, y los niveles son habitualmente elevados con TVP y/o EP. Los niveles normales pueden excluir la TEV, pero los niveles elevados de dímero D son no específicos y tienen un bajo valor predictivo positivo. Los ensayos de dímero D difieren notablemente en sus propiedades de diagnóstico de TEV. Un resultado normal con un ensayo de dímero D muy sensible (concretamente sensibilidad de aproximadamente un 98 %) excluye la TEV por sí mismo [concretamente, tiene un alto valor predictivo negativo (VPN)]. Sin embargo, las pruebas de dímero D muy sensibles tienen baja especificidad (aproximadamente un 40 %), lo que limita su uso debido a las altas tasas de falsos positivos. Para excluir TVP y/o EP, un resultado normal con un ensayo de dímero D menos sensible (concretamente de aproximadamente un 85 %) tiene que combinarse con una baja probabilidad clínica u otra prueba objetiva que tenga un alto VPN pero no sea diagnóstica por sí misma (p.ej., ultrasonido venoso negativo de las venas proximales). Ya que los ensayos de dímero D menos sensibles son más específicos (aproximadamente un 70 %), procuran menos resultados falsos positivos.

50 La especificidad del dímero D se reduce con la edad y la comorbilidad, tal como con cáncer. Consiguientemente, los análisis con dímero D pueden tener un valor limitado como prueba de diagnóstico para TEV en pacientes hospitalizados (más resultados falsos positivos) y no es de ayuda en el periodo postoperatorio temprano.

### 55 Venografía tomográfica computerizada (TC) y venografía de resonancia magnética (RM)

60 La venografía TC y venografía de RM tienen el potencial de diagnosticar TVP en entornos en que la exactitud de la ultrasonografía por compresión está limitada (p.ej., TVP pélvica aislada, pacientes asintomáticos). La sensibilidad y especificidad de la venografía TC en comparación con la ultrasonografía por compresión para detectar todas las TVP se han reseñado entre 89 y 100 % y 94 y 100 %, respectivamente. Sin embargo, dado el coste, la exposición a radiación y la disponibilidad limitada de la venografía TC, esta modalidad desempeña actualmente un papel limitado en el diagnóstico de TVP. Un metanálisis de estudios que comparan la venografía por RM con la venografía convencional reseñó una sensibilidad combinada del 92 % y una especificidad del 95 % de la venografía por RM para TVP proximal. Como con la venografía CT, el coste y disponibilidad inhibirán el uso extendido de la RM para el diagnóstico de TV aguda.

65

**Diagnóstico de embolia pulmonar (EP)**

Los rasgos clínicos de la EP pueden incluir:

- 5
- dolor torácico pleurítico,
  - falta de aliento,
  - síncope,
  - hemoptisis, y
  - palpitaciones.

10 Como con la TVP, estos rasgos son no específicos y debe efectuarse un análisis objetivo para confirmar o excluir el diagnóstico de EP.

**Angiografía pulmonar**

15 Esta es la prueba de referencia estándar para el diagnóstico de EP. Sin embargo, tiene muchas de las mismas limitaciones que la venografía.

**Angiografía pulmonar tomográfica computerizada (APTC)**

20 La TC espiral (también conocida como TC helicoidal) con inyección periférica de contraste radiográfico (APTC) es la prueba de diagnóstico estándar actual para EP (Stein PD. N. Engl. J. Med. 2006. 354: 2317-2327, Roy PM. Br. Med. J. 2005; 331: 259). En comparación con la gammagrafía pulmonar de ventilación y perfusión, la APTC es menos probable que sea “no diagnóstica” (concretamente aproximadamente 10 frente a 60 %) y tiene el potencial de identificar una etiología alternativa para los síntomas del paciente. Esta técnica tiene una sensibilidad del 83 %, una especificidad del 96 %, VPN del 95 % y valor predictivo positivo del 86 % para EP.

25 La exactitud de la APTC varía según el tamaño de la arteria pulmonar mayor implicada y según la probabilidad preanálisis clínico. Por ejemplo, el valor predictivo positivo de la APTC es del 97 % para embolia pulmonar en la arteria principal o lobular, pero cae al 68 % para arterias segmentarias, y es aún menor para EP en las arterias subsegmentarias (25 %). En pacientes con una alta probabilidad preanálisis clínico de EP, el valor predictivo positivo de la APTC es de un 96 %, pero este valor cae al 92 % en pacientes con una probabilidad técnica preanálisis clínico de EP y al 58 % en pacientes con una baja probabilidad preanálisis clínico de EP.

30 En estudios de tratamiento que usaban la APTC para diagnosticar EP, menos de un 2 % de los pacientes que habían aplazado la terapia anticoagulante basándose en una APTC negativa siguieron teniendo TEV sintomática durante el seguimiento. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren lo siguiente:

- 35
- una APTC normal de buena calidad excluye a EP si la sospecha clínica es baja o moderada.
  - Los defectos intraluminales de arterias lobulares o mayores son generalmente diagnósticos de EP.
  - Los defectos intraluminales de arterias pulmonares segmentarias son generalmente diagnósticos de EP si la sospecha clínica es moderada o alta, pero deberían considerarse como sin diagnóstico si la sospecha es baja o hay hallazgos disconformes (p.ej. dímero D negativo).
  - Los defectos intraluminales de arterias pulmonares subsegmentarias son no diagnósticos y los pacientes con dichos hallazgos requieren análisis adicionales.
- 40
- 45

Nota de advertencia: Si es posible, la APTC debería evitarse en mujeres jóvenes (p.ej. menores de 40 años) porque suministra una dosis de radiación sustancial al pecho, lo que aumenta el riesgo de cáncer de mama.

**50 Gammagrafía pulmonar de ventilación y perfusión**

En el pasado, la gammagrafía pulmonar de ventilación y perfusión era la investigación inicial en pacientes con sospecha de EP, y sigue siendo útil en pacientes con contraindicaciones al tinte de contraste de rayos X (p.ej. insuficiencia renal) y pacientes con alto riesgo de desarrollo de cáncer de mama por exposición a radiación (p.ej., mujeres jóvenes). Una gammagrafía de perfusión normal puede excluir la EP, pero se encuentra solo en una minoría de pacientes (10-40 %). Los defectos de perfusión son no específicos: solo aproximadamente un tercio de los pacientes con defectos de perfusión tienen EP. La probabilidad de que un defecto de perfusión esté causado por la EP aumenta con su tamaño y número y la presencia de una gammagrafía de ventilación normal (defecto “discordante”). Una gammagrafía pulmonar con defectos de perfusión segmentarios o mayores discordantes se califica de “alta probabilidad”. Un defecto discordante único está asociado a una prevalencia de EP de aproximadamente un 80 %. Tres o más defectos discordantes están asociados a una prevalencia de EP de aproximadamente un 90 %. Los hallazgos de gammagrafía pulmonar son altamente dependientes de la edad, con una proporción relativamente alta de gammagrafías normales y una proporción baja de gammagrafías no diagnósticas en pacientes jóvenes. Se observa también una alta frecuencia de gammagrafías pulmonares normales

55

60

en pacientes embarazadas en que se investiga la EP.

**Valoración clínica:**

5 Como con la sospecha de TVP, la valoración clínica es útil para catalogar la probabilidad de EP.

**Análisis de dímero D:**

10 Como se discute anteriormente cuando se considera el diagnóstico de TVP, un resultado de dímero D normal, solo o en combinación con otra prueba negativa, puede usarse para excluir la EP.

**Pacientes con combinaciones de pruebas no invasivas de EP no diagnósticas**

15 Los pacientes con resultados de ensayo no diagnósticos en la presentación de EP tienen una prevalencia de EP de aproximadamente un 20 %, por lo tanto se requieren investigaciones adicionales para excluir la EP.

**Diagnóstico de EP en el embarazo**

20 Las pacientes embarazadas con sospecha de EP pueden tratarse de forma similar a las pacientes no embarazadas, con las siguientes modificaciones:

- El ultrasonido venoso de las piernas debería efectuarse en primer lugar seguido de gammagrafía pulmonar de ventilación y perfusión si no hay TVP.
- La cantidad de radioisótopos usada para la gammagrafía de perfusión debería reducirse y alargarse la duración de la gammagrafía.
- Si se efectúa una angiografía pulmonar, se prefiere el enfoque braquial con examen abdominal.
- El uso de la APTC en el embarazo se desaconseja, principalmente debido a la exposición a radiación de la madre.

30 **C) Riesgo de recurrencia después de un primer episodio de tromboembolia venosa sintomática**

35 La tromboembolia venosa está asociada a diversos factores de riesgo, algunos de los cuales son transitorios tales como cirugía reciente y embarazo, y otros de los cuales son persistentes tales como cáncer (la Tabla 1 muestra los factores de riesgo para tromboembolia venosa). Cuando la tromboembolia venosa está asociada a un factor de riesgo adquirido, transitorio o persistente, se le denomina provocada. Cuando no hay un factor de riesgo clínico evidente, se le denomina no provocada o idiopática.

Tabla 1. Factores de riesgo para tromboembolia venosa

Factores de riesgo transitorios principales	Factores de riesgo adquiridos o persistentes potenciales
Hospitalización	Enfermedades vasculares del colágeno
Inmovilización con escayola	Insuficiencia cardíaca
Cirugía	Malignidad
Traumatismo	Medicaciones
<b>Factores de riesgo transitorios menores</b>	Trastornos mieloproliferativos
Anticonceptivos orales o terapia hormonal	Síndrome nefrótico
Embarazo	
Presencia de factores de riesgo principales 1 a 3 meses antes de la tromboembolia venosa	
Viaje prolongado (≥ 2 horas)	

40 Se ha reconocido recientemente que la presencia o ausencia de un factor de riesgo transitorio o reversible en el momento de la tromboembolia venosa afecta en gran medida al riesgo de recurrencia después de dejar la terapia anticoagulante. Los pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio tienen un bajo riesgo de recurrencia en comparación con los pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo persistente o tromboembolia venosa no provocada (Alfonso Iorio. *Arch. Intern. Med.* 2010; 170: 1710-1716).

45 Por esta razón, los pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio se tratan habitualmente con agentes anticoagulantes durante 3 meses (Alfonso Iorio. *Arch. Intern. Med.* 2010; 170: 1710-1716), mientras que los pacientes con tromboembolia venosa que no estaba asociada a un factor de riesgo transitorio se tratan a menudo a largo plazo (Alfonso Iorio. *Arch. Intern. Med.* 2010; 170: 1710-1716). El riesgo acumulado de recurrencia a los 1, 5 y 10 años es de 15, 41 y 53 %, respectivamente, en pacientes con una tromboembolia venosa idiopática, en comparación con 7, 16 y 23 % en pacientes con un evento provocado (Galio



NJ. Am. Fam. Physician. 2011; 83: 293-300).

5 Aunque es ampliamente aceptado que el riesgo de recurrencia en pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio es suficientemente bajo para justificar dejar la terapia anticoagulante después de 3 meses, este riesgo de recurrencia no está bien cuantificado. Además, el riesgo de recurrencia puede no ser el mismo en todos los pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio.

**D) Riesgo de trombosis arterial**

10 La trombosis arterial es una causa común de ingreso hospitalario, muerte e incapacidad en países desarrollados (y cada vez más en naciones en desarrollo debido a las epidemias globales de tabaquismo, obesidad y diabetes). Sigue habitualmente a la ruptura espontánea de una placa aterosclerótica, y puede:

- ser clínicamente asintomático;
- 15 • contribuir a la progresión aterosclerótica que da como resultado estenosis coronaria y angina estable, o estenosis y claudicación de arterias de los miembros inferiores;
- presentarse como isquemia aguda en el corazón (síndromes coronarios cardiacos: angina inestable, infarto de miocardio), cerebro (ataque isquémico transitorio o apoplejía) o miembros (isquemia aguda de miembro).

20 Los factores de riesgo tradicionales (véase la Tabla 2) siguen siendo los marcadores más importantes de enfermedad arterial.

25 Tabla 2

<b>Factores de riesgo</b>
Dislipemia
Fumador actual
Diabetes
Hipertensión
Obesidad abdominal
Factores psicosociales

30 Las mutaciones de factor V Leiden y G20210A de protrombina muestran asociaciones discretas pero estadísticamente significativas con enfermedad cardiaca coronaria, apoplejía y eventos arteriales periféricos, especialmente en personas jóvenes (menos de 55 años de edad) y en mujeres. La relación de G2010A de protrombina con trombosis arterial es muy discreta (CP 1,32; IC del 95 % 1,03-1,69) (Kim R.J. Am. Heart J. 2003; 146: 948-957). La relación de la mutación del factor V Leiden y los eventos isquémicos arteriales es también discreta (CP 1,21; IC del 95 % 0,99-1,49), los pacientes de <55 años tenían un mayor riesgo de evento isquémico arterial (CP 1,37; IC del 95 % 0,96-1,97) (Kim R.J. Am. Heart J. 2003; 146: 948-957).

35 Existen pocas evidencias de que otras trombofilias congénitas estén asociadas a un riesgo aumentado de enfermedad arterial.

**Necesidad de nuevos factores de riesgo**

40 A pesar de la existencia anteriormente mencionada de factores de riesgo y herramientas de diagnóstico para el diagnóstico temprano, la trombosis arterial y la tromboembolia venosa, que incluye trombosis venosa profunda y embolia pulmonar, son las causas principales de morbilidad y mortalidad.

45 Incluso entre los grupos de alto riesgo, no es posible identificar a los individuos que irán a desarrollar trombosis y/o tromboembolia venosa. Por lo tanto, aunque existen varias estrategias tanto para precisar la identificación del riesgo de desarrollar un evento tromboembólico, para su prevención como para el diagnóstico preciso de una enfermedad tromboembólica, el objetivo de prevenir la carga clínica de la trombosis y/o tromboembolia no se ha alcanzado todavía (Ruppert A. Current Medical Research & Opinion 2010; 26: 2455-2473).

50 Se han realizado varios intentos de usar diagnósticos moleculares para identificar sujetos con alto riesgo de desarrollar un evento trombótico y/o tromboembólico a partir del hallazgo de una mutación de aminoácido común en el gen del factor V por Bertina (Bertina RM. Nature 1994: 369: 64-67), la descripción de la variante de secuencia 3' no codificante 20210 de protrombina (Poort SR. Blood 1996; 88: 3698-3703) y la variante de 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa C677T termolábil. Hay también documentos de patente tales como EPO0696325B1 que describen el uso de mutaciones en factores de coagulación. El documento EPO0696325B1 describe el uso de mutaciones en el factor V para identificar a personas con riesgo de desarrollar un evento trombótico. O el documento de patente WO05047533A1, que describe un procedimiento para detectar la presencia o

ausencia de un nucleótido variante en al menos dos sitios de SNP asociados a trombosis, estando seleccionados dichos sitios de SNP del grupo consistente en G1691A de factor V Leiden, G20210A de protrombina (factor II), C677T de MTHFR, A1298C de MTHFR, G4377T de factor XIII y C536T de inhibidores plasmáticos de factor tisular (TFPI). Pueden encontrarse divulgaciones adicionales de grupos de marcadores asociados a eventos o enfermedades tromboticos en los documentos US2007/054275A1, WO2008020090A1, US2005/026168A1 y EP1398388A2.

Sin embargo, ninguno de los intentos probados hasta ahora ha probado una eficacia satisfactoria y el entusiasmo inicial por la adopción de una prueba tendrá que atemperarse por la evidencia formal de un beneficio clínico derivado de la prueba.

Por consiguiente, existe la necesidad de marcadores novedosos, incluyendo nuevos marcadores genéticos y combinaciones específicas de los mismos que predigan exitosa y ventajosamente quién tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad tromboembólica y/o complicaciones de enfermedad tromboembólica tales como, pero sin limitación, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, síndromes coronarios agudos (infarto de miocardio agudo, angina inestable), apoplejía, ataque isquémico transitorio o apoplejía de un modo en que puedan ponerse en marcha medidas preventivas para mantener ese riesgo lo más bajo posible.

Existe también la necesidad de marcadores novedosos, incluyendo nuevos marcadores genéticos y combinaciones específicas de los mismos que ayuden exitosa y ventajosamente al diagnóstico de una enfermedad tromboembólica y/o complicaciones de enfermedad tromboembólica tales como, pero sin limitación, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, síndromes coronarios agudos (infarto de miocardio agudo, angina inestable), apoplejía, ataque isquémico transitorio o apoplejía de un modo en que puedan ponerse en marcha medidas preventivas para mantener ese riesgo lo más bajo posible.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento que es adecuado para resolver las limitaciones de los procedimientos usados hoy en día para estimar el riesgo de tromboembolia y/o de diagnosticar los eventos tromboembólicos para un sujeto particular.

El procedimiento proporcionado según la presente invención resuelve las limitaciones comprendiendo las etapas de determinar en una muestra aislada de dicho sujeto la presencia de las siguientes variantes genéticas Arg67Stop (rs2232698) de serpina A10 (inhibidor de proteína Z), Ala384Ser (Cambridge II) de serpina C1 (antitrombina), C46T (rs1801020) de factor XII, Val34Leu (rs5985) de factor XIII, G20210A (rs1799963) de factor II (protrombina), Arg506Gln (rs6025) de factor V Leiden, Arg306Thr de factor V Cambridge, Arg306Gly de factor V Hong Kong, rs8176719 de grupo sanguíneo ABO, rs7853989 de grupo sanguíneo ABO, rs8176743 de grupo sanguíneo ABO y rs8176750 de grupo sanguíneo ABO indicativas del riesgo de padecer un evento tromboembólico (infarto de miocardio agudo mortal o no mortal, o apoplejía o ataque isquémico transitorio o arteriopatía periférica o trombosis venosa profunda o embolia pulmonar), que es mejor que la valoración de riesgo realizada por los procedimientos en uso hoy en día.

En un aspecto, la invención se refiere a procedimientos para el establecimiento de la probabilidad de un individuo de presentar un evento tromboembólico basado en la presencia de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, en los que se da el riesgo.

En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para el establecimiento de la probabilidad de un individuo de presentar un evento tromboembólico basado en la presencia de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, características sociodemográficas y clínicas, en los que se da el riesgo.

En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para ayudar al diagnóstico de un evento tromboembólico basado en la presencia de las variantes genéticas mencionadas anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, características sociodemográficas y clínicas, en los que se da la probabilidad de diagnóstico.

En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para el establecimiento de la necesidad de medidas preventivas para prevenir el desarrollo de un evento tromboembólico basado en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, características sociodemográficas y clínicas, en los que se da el riesgo

“Evento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud debería entenderse como la alteración de la hemostasia que conduce al desarrollo de un coágulo sanguíneo (trombo) dentro de un vaso sanguíneo (arteria o vena). El trombo puede incluso obstruir el vaso sanguíneo completamente y/o desprenderse y obstruir otro vaso sanguíneo.

“Evento tromboembólico” incluye, entre otras, las siguientes afecciones: trombosis arterial, infarto de miocardio

mortal y no mortal, apoplejía, ataques isquémicos transitorios, trombosis venosa cerebral, arteriopatía periférica, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

5 “Evento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud se usa intercambiamente con “tromboembolia”.

“Evento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud se usa intercambiamente con “trombosis”.

10 “Evento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud se usa intercambiamente con “complicación tromboembólica”.

15 “Trombofilia” en el contexto de esta solicitud debería entenderse como los trastornos de la hemostasia que predisponen a la trombosis. Se incluyen las deficiencias hereditarias de los anticoagulantes naturales antitrombina, proteína C y proteína S y mutaciones comunes en los genes que codifican factores de coagulación y trombofilias adquiridas tales como anticuerpos antifosfolípidos.

Los términos “enfermedad” y “trastorno” se interpretarán en el contexto de esta solicitud intercambiamente.

20 “Mutación” en el contexto de esta solicitud debería entenderse como el cambio de la estructura de un gen resultante en una forma variante que puede transmitirse a generaciones posteriores, causado por la alteración de unidades básicas individuales en el ADN, o la delección, inserción o transposición de secciones mayores de genes o cromosomas.

25 “Variantes genéticas” en el contexto de esta solicitud hace referencia a diferencias genéticas tanto en como entre poblaciones. Puede haber múltiples variantes de cualquier gen dado en la población humana (alelos) conduciendo a polimorfismo.

30 Los términos “polimorfismo” y “polimorfismo de nucleótido simple” (SNP) se usan en la presente memoria intercambiamente y se refieren a una variación de la secuencia nucleotídica que tiene lugar cuando un solo nucleótido en el genoma u otra secuencia compartida difiere entre miembros de la especie o entre cromosomas apareados en un individuo. Un SNP puede designarse también como una mutación con una baja frecuencia alélica mayor de aproximadamente 1 % en una población definida. Los polimorfismos de nucleótido simple según la presente solicitud pueden entrar dentro de las secuencias de codificación de genes, regiones no codificantes o las regiones intrónicas entre genes.

35 El término “muestra”, como se usa en la presente memoria” hace referencia a cualquier muestra de una fuente biológica e incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos, material biopsiado obtenido de un mamífero o extractos del mismo, y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

40 “Factores de riesgo convencionales” en el contexto de esta solicitud deberían entenderse como aquellos descritos en las Tablas 1 y 2.

45 “Características sociodemográficas y clínicas” en el contexto de esta solicitud deberían entenderse como edad, género, diabetes sacarina, tabaquismo, historial familiar de eventos tromboembólicos, embarazo e índice de masa corporal.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un programa informático o soporte informático que contiene medios para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos de la invención.

50 Es también parte de la presente divulgación un kit que comprende reactivos para detectar las variantes genéticas Arg67Stop (rs2232698) de serpina A10 (inhibidor de proteína Z), Ala384Ser (Cambridge II) de serpina C1 (antitrombina), C46T (rs1801020) de factor XII, Val34Leu (rs5985) de factor XIII, G20210A (rs1799963) de factor II (protrombina), Arg506Gln (rs6025) de factor V Leiden, Arg306Thr de factor V Cambridge, Arg306Gly de factor V Hong Kong, rs8176719 de grupo sanguíneo ABO, rs7853989 de grupo sanguíneo ABO, rs8176743 de grupo sanguíneo ABO y rs8176750 de grupo sanguíneo ABO.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

60 Los autores de la presente invención han resuelto los problemas identificados anteriormente en los procedimientos en uso actualmente para el cálculo del riesgo en un sujeto de desarrollar un evento tromboembólico, como se ha definido este término anteriormente.

65 Los autores de la presente invención han identificado una serie de variantes genéticas que están asociadas al riesgo de presentar un evento tromboembólico. Estas variantes genéticas muestran valor predictivo y de diagnóstico.

**Procedimiento para resolver las limitaciones de los procedimientos para la predicción del riesgo de**

**desarrollar un evento tromboembólico o para el diagnóstico de un evento tromboembólico.**

La presente solicitud resuelve la limitación anteriormente descrita de los procedimientos usados hoy en día para calcular el riesgo de evento tromboembólico y/o para diagnosticar un evento tromboembólico. Se usa una combinación particular (como se describe anteriormente) de marcadores genéticos, seleccionados y evaluados por los inventores después de un análisis complejo y genuino de miles de posibles marcadores. De las diferentes posibilidades para construir un índice de riesgo genético (IRG), los inventores han seleccionado una particular debido a que proporcionaba los mejores resultados posibles. Para calcular la puntuación de riesgo genético, se considera el número acumulado de alelos de riesgo de aquellos SNP enumerados en la tabla 3 que están presentes en cada individuo. Para cada una de las variantes estudiadas, cada individuo puede tener 0, 1 o 2 alelos de riesgo. Al haber calculado el sumatorio de alelos de riesgo acumulados en el diferente conjunto de variantes seleccionadas (n= 12), se dio para cada individuo un índice que podía ir de 0 a 24. Los inventores han generado nuevos algoritmos para la estimación del riesgo tromboembólico.

Tabla 3

Gen	SNP provisional (nombre)	ID de referencia de la variante	rs	Alelo informativo	Otro alelo
FXII	46C>T	FXII, 46C>T	1801020	T	C
Grupo sanguíneo ABO (alelo A1)	261delG	Grupo sanguíneo ABO	8176719	G	delG
	526C>G	Grupo sanguíneo ABO	7853989	C	G
	703G>A	Grupo sanguíneo ABO	8176743	G	A
	1059delC	Grupo sanguíneo ABO	8176750	C	delC
SERPINA A10	728C>T	Serpina A10, Arg67Stop	2232698	T	C
SERPINA C1	Serpina C1, Ala384Ser (Cambridge II)	Serpina C1, Ala384Ser (Cambridge II)	--	T	G
Factor de coagulación FV	FV Leiden (1746G>A)	FV, R506Q (F5 Leiden)	6025	A	G
	FV Cambridge (1146G>C)	FV, R306T (F5 Cambridge)	--	C	G
	FV Hong Kong (1145A>G)	FV, R306G (F5 Hong Kong)	--	G	A
Factor de coagulación XIII (polipéptido A1)	V34L (226G>T)	FXIII, Val34Leu, rs	5985	G	T
Factor de coagulación II	G20210A	Protrombina, G20210A	1799963	A	G

Se da en la Tabla 3 la lista de polimorfismos que se usan en este procedimiento de la presente invención.

Cuando se usan modelos predictivos, como por ejemplo para tomar decisiones de tratamiento, los riesgos predictivos pueden clasificarse usando umbrales de corte de riesgo.

Los especialistas en la materia reconocerán fácilmente que el análisis de los nucleótidos presentes según el procedimiento de la invención en el ácido nucleico de un individuo puede realizarse mediante cualquier procedimiento o técnica capaz de determinar los nucleótidos presentes en un sitio polimórfico. Como resulta obvio en la materia, los nucleótidos presentes en los marcadores polimórficos pueden determinarse a partir de cualquier hebra de ácido nucleico o de ambas hebras.

Una vez se ha obtenido una muestra biológica de un sujeto (p.ej. un fluido corporal tal como orina, saliva, plasma, suero o una muestra de tejido tal como muestra de tejido bucal o células bucales), se emprende típicamente la detección de una variación de secuencia o SNP de variante alélica. Puede emplearse prácticamente cualquier procedimiento conocido por el especialista en la materia. Quizás el procedimiento más directo es determinar realmente la secuencia del ADN genómico o ADNc y comparar estas secuencias con los SNP de alelos conocidos del gen. Este puede ser un proceso bastante caro y laborioso. No obstante, esta tecnología es bastante común y bien conocida.

Puede usarse en los procedimientos de la invención cualquiera de una variedad de procedimientos que existen para detectar variaciones de secuencia. El procedimiento particular usado no es importante en la estimación del riesgo cardiovascular o la selección del tratamiento.

Existen otros procedimientos comercialmente disponibles posibles para la identificación de SNP de alto rendimiento sin usar tecnologías de secuenciación directa, por ejemplo la tecnología Veracode de Illumina, la química de genotipado de SNP Taqman® y química de genotipado de SNP KASPar.

Es una variación del procedimiento de determinación de secuencia directo el procedimiento Gene Chip™

disponible en Affymetrix. Como alternativa, están también comercialmente disponibles modos robustos y menos caros de detectar la variación de secuencia de ADN. Por ejemplo, Perkin Elmer ha adaptado su ensayo TAQman (™) para detectar la variación de secuencia. Orchid BioSciences tiene un procedimiento denominado SNP-IT (™) (tecnología de identificación de SNP) que usa la extensión por cebador con análogos nucleotídicos marcados para determinar cuál nucleótido aparece en la posición inmediatamente 3' de una sonda oligonucleotídica, y la base extendida se identifica entonces usando fluorescencia directa, un ensayo colorimétrico indirecto, espectrometría de masas o polarización de fluorescencia. Sequenom usa una tecnología de captura por hibridación más MALDI-TOF (espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo) para detectar los genotipos de SNP con su sistema MassARRAY(™). Promega proporciona el sistema de genotipado de SNP READIT(™) (patente de EE.UU. nº 6.159.693). En este procedimiento, se hibridan sondas de ADN o ARN con secuencias de ácido nucleico diana. Se despolimerizan sondas que son complementarias de la secuencia diana en cada base con una mezcla comercial de enzimas, mientras que las sondas que difieren de la diana en la posición de investigación permanecen intactas. El procedimiento usa la química de fosforilación en combinación con detección con luciferasa para proporcionar un sistema de puntuación de SNP altamente sensible y adaptable. Third Wave Technologies tiene el procedimiento Invader OS(™) que usa enzimas Cleavaseg comerciales que reconocen y cortan solo la estructura específica formada durante el proceso Invader. Invader OS se basa en la amplificación lineal de la señal generada por el proceso Invader, en lugar de en la amplificación exponencial de la diana. El ensayo Invader OS no utiliza PCR en ninguna parte del ensayo. Además, hay una serie de laboratorios de análisis del ADN forenses y muchos laboratorios de investigación que usan PCR específica de gen, seguida de digestión con endonucleasa de restricción y electroforesis en gel (u otra tecnología de separación por tamaño) para detectar los polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (RFLP).

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, se identifica la presencia o ausencia de SNP amplificando o no consiguiendo amplificar un producto de amplificación a partir de la muestra. Las amplificaciones polinucleotídicas son típicamente dependientes de molde. Dichas amplificaciones se basan generalmente en la existencia de una hebra molde para hacer copias adicionales del molde. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos que pueden cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde que hibridan con la hebra molde. Típicamente, los cebadores son de 10 a 30 pares de bases de longitud, pero pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque se prefiere generalmente la forma monocatenaria. A menudo, se diseñan pares de cebadores para hibridar selectivamente con distintas regiones de un ácido nucleico molde, y se ponen en contacto con el ADN molde en condiciones que permitan la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, pueden seleccionarse condiciones de hibridación de alto rigor que permitirán solo la hibridación con secuencias que sean completamente complementarias de los cebadores. En otras realizaciones la hibridación puede tener lugar con rigor reducido, permitiendo la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más desapareamientos con las secuencias cebadoras. Una vez hibridado, se pone en contacto el complejo molde-cebador con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiendo de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, a las que se hace referencia también como "ciclos", hasta producir una cantidad suficiente de producto de amplificación.

#### 40 Reacción en cadena de la polimerasa

Están disponibles una serie de procesos dependientes de molde para amplificar las secuencias oligonucleotídicas presentes en una muestra de molde dada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa. En la PCR, se usan pares de cebadores que hibridan selectivamente con ácidos nucleicos en condiciones que permitan la hibridación selectiva. El término "cebador", como se usa en la presente memoria, engloba cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria o monocatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Los cebadores se usan en uno cualquiera de una serie de procesos dependientes de molde para amplificar las secuencias génicas diana presentes en una muestra de molde dada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es la PCR, que se describe con detalle en las patentes de EE.UU. nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159. En la PCR, se preparan dos secuencias cebadoras que son complementarias de regiones en hebras complementarias opuestas de la secuencia del gen o genes diana. Los cebadores hibridarán formando un complejo de ácido nucleico:cebador si la secuencia del gen o genes diana está presente en una muestra. Se añade un exceso de trifosfatos de desoxirribonucleósido a la mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, p.ej. polimerasa Taq, que facilita la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Si se ha formado el complejo de secuencia de gen o genes diana:cebador, la polimerasa causará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia del gen o genes diana añadiendo nucleótidos. Al elevar y reducir la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del gen o genes diana formando productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al gen o genes diana y a los productos de reacción y se repite el proceso. Estas múltiples rondas de amplificación, a las que se hace referencia como "ciclos", se realizan hasta producir una cantidad suficiente de producto de amplificación.

El producto de amplificación puede digerirse con una enzima de restricción antes del análisis. En aún otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, se identifica la presencia o ausencia de SNP hibridando la muestra de ácido nucleico con un cebador marcado con un resto detectable. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, se detecta el resto detectable en un ensayo enzimático, radioensayo, inmunoensayo o

detectando fluorescencia. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el cebador está marcado con un tinte detectable (p.ej., SYBR verde I, YO-PRO-I, naranja de tiazol, Hex, Picogreen, EDANS, fluoresceína, FAM o TET). En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, los cebadores se localizan en un chip. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, los cebadores para amplificación son específicos de dichos SNP.

Es otro procedimiento para amplificación la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"). La LCR difiere de la PCR porque amplifica la molécula de sonda en lugar de producir un amplicón mediante la polimerización de nucleótidos. En la LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias y, en presencia de una secuencia diana, se unirá cada par a hebras complementarias opuestas de la diana de tal modo que se ensamblen. En presencia de una ligasa, se ligarán los dos pares de sondas formando una sola unidad. Mediante ciclación a temperatura, como en la PCR, las unidades ligadas unidas se disociarán de la diana y servirán entonces como "secuencias diana" para el ligamiento de los pares de sondas en exceso. La patente de EE.UU. n° 4.883.750 describe un procedimiento similar a la LCR para unir pares de sondas a una secuencia diana.

#### Amplificación isotérmica

Puede ser también útil en la amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención un procedimiento de amplificación isotérmica en que se usan endonucleasas de restricción y ligasas para conseguir la amplificación de moléculas diana que contienen 5'-[[ $\alpha$ ]-tio]-trifosfatos de nucleótidos en una hebra de un sitio de restricción. En una realización, se usa el procedimiento de amplificación isotérmica mediado por bucle (LAMP) para el tipado de polimorfismo de nucleótido simple (SNP).

#### Amplificación por desplazamiento de hebra

La amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) es otro procedimiento para llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples rondas de desplazamiento y síntesis de hebra, concretamente traslación de muesca. Un procedimiento similar, llamado reacción en cadena de reparación (RCR), implica asociar varias sondas a lo largo de una región diana para amplificación, seguido de una reacción de reparación en que están presentes solo dos de las cuatro bases. Las otras dos bases pueden añadirse como derivados biotinilados para una detección sencilla.

#### Amplificación basada en la transcripción

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas basados en la transcripción, incluyendo amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico. En la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico, se preparan los ácidos nucleicos para amplificación mediante extracción con fenol/cloroformo estándar, desnaturalización térmica de una muestra clínica, tratamiento con tampón de lisis y columnas Minispin para el aislamiento de ADN y ARN o extracción con cloruro de guanidinio del ARN. Estas técnicas de amplificación implican asociar un cebador que tiene secuencias específicas de diana. Después de la polimerización, se digieren los híbridos de ADN/ARN con ARNasa H mientras que las moléculas de ADN bicatenarias se desnaturalizan térmicamente de nuevo. En cualquier caso, el ADN monocatenario se vuelve totalmente bicatenario mediante la adición del segundo cebador específico de diana, seguido de polimerización. Las moléculas de ADN bicatenarias se transcriben entonces de forma múltiple por una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, se transcriben de forma inversa los ARN a ADN bicatenario y se transcriben de nuevo con una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, truncados o completos, indican secuencias específicas de diana.

Pueden usarse otros procedimientos de amplificación de acuerdo con la presente invención. En una realización, se usan cebadores "modificados" en una síntesis de tipo PCR dependiente de molde y enzima. Los cebadores pueden modificarse marcando con un resto de captura (p.ej. biotina) y/o un resto detector (p.ej. enzima). En presencia de una secuencia diana, la sonda se une y se escinde catalíticamente. Después de la escisión, se libera la secuencia diana intacta para unirse a la sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana. En otro enfoque, un proceso de amplificación de ácido nucleico implica sintetizar cíclicamente ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc), que pueden usarse de acuerdo con la presente invención. El ARNmc es un primer molde para un primer oligonucleótido cebador, que se alarga por transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). Se retira entonces el ARN del dúplex de ADN:ARN resultante mediante la acción de la ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica de ARN en dúplex con ADN o ARN). El ADNmc resultante es un segundo molde para un segundo cebador que incluye también las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (ejemplificado por ARN polimerasa T7) en 5' a su homología con el molde. Se extiende entonces este cebador por ADN polimerasa (ejemplificada por el fragmento "Klenow" grande de la ADN polimerasa I de *E. coli*), dando como resultado una molécula de ADN bicatenario ("ADNbc") que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los cebadores y que tiene adicionalmente, en un extremo, una secuencia promotora. Esta secuencia promotora puede usarse por la ARN polimerasa apropiada para hacer muchas copias de ARN del ADN. Estas copias pueden volver a entrar en el ciclo, conduciendo a una amplificación muy rápida. Con la elección apropiada de enzimas, esta amplificación puede realizarse isotérmicamente sin la adición de enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este proceso, la secuencia de partida puede elegirse para estar en forma de

cualquier ADN o ARN.

#### Procedimientos para la separación de ácido nucleico

5 Puede ser deseable separar los productos de ácido nucleico de otros materiales, tales como molde y cebador en exceso. En una realización, se separan los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poli-acrilamida usando procedimientos estándares (Sambrook *et al.*, 1989, véase a continuación). Los productos de amplificación separados pueden cortarse y eluirse del gel para manipulación adicional. Usando geles de agarosa de bajo punto de fusión, la banda separada puede retirarse mediante calentamiento del gel, seguido de extracción del ácido nucleico. La separación de los ácidos nucleicos puede efectuarse también mediante técnicas cromatográficas conocidas en la materia. Hay muchas clases de cromatografía que pueden usarse en la práctica de la presente invención, incluyendo cromatografía de adsorción, reparto, intercambio iónico, hidroxipatito, tamiz molecular, fase inversa, columna, papel, capa fina y gases, así como HPLC. En ciertas realizaciones, se visualizan los productos de amplificación. Un procedimiento de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de bandas bajo luz UV. Como alternativa, si los productos de amplificación se marcan integralmente con nucleótidos marcados radiométrica o fluorométricamente, los productos de amplificación separados pueden exponerse a película de rayos X o visualizarse con luz que exhiba los espectros excitatorios apropiados.

20 Como alternativa, puede determinarse la presencia de posiciones polimórficas según los procedimientos de la invención mediante la hibridación o falta de hibridación con una sonda de ácido nucleico adecuada específica de un ácido nucleico polimórfico pero no con el ácido nucleico no mutado. Se entiende por "hibridar" un par que forma una molécula bicatenaria entre secuencias polinucleotídicas complementarias, o porciones de las mismas, en diversas condiciones de rigor. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa será normalmente menor de NaCl aproximadamente 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferiblemente menor de NaCl aproximadamente 500 mM NaCl y citrato trisódico 50 mM, y más preferiblemente menor de NaCl aproximadamente 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Puede obtenerse una hibridación de bajo rigor en ausencia de disolvente orgánico, p.ej. formamida, mientras que puede obtenerse una hibridación de alto rigor en presencia de al menos aproximadamente un 35 % de formamida, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 50 % de formamida. Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán normalmente temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37 °C, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 42 °C. Variar parámetros adicionales, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, p.ej. dodecilsulfato de sodio (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN portador, son bien conocidos por los especialistas en la materia. Se logran diversos niveles de rigor combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización preferida, la hibridación tendrá lugar a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y 1 % de SDS. En una realización más preferida, la hibridación tendrá lugar a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, 1 % de SDS, 35 % de formamida y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNmc) 100 µg/ml. En la realización más preferida, tendrá lugar la hibridación a 42 °C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, 1 % de SDS, 50 % de formamida y ADNmc 200 µg/ml. Resultarán evidentes para los especialistas en la materia variaciones útiles de estas condiciones.

45 Para la mayoría de aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación variarán también en rigor. Las condiciones de rigor de lavado pueden definirse por la concentración salina y la temperatura. Como anteriormente, el rigor puede aumentarse reduciendo la concentración salina o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración salina rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente NaCl menor de aproximadamente 30 mM y citrato de sodio 3 mM, y lo más preferiblemente NaCl menor de aproximadamente 15 mM y citrato de sodio 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán normalmente una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42 °C y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 68 °C. En una realización preferida, las etapas de lavado tendrán lugar a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y 0,1 % de SDS. En una realización más preferida, las etapas de lavado tendrán lugar a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato de sodio 1,5 mM y 0,1 % de SDS. En una realización más preferida, las etapas de lavado tendrán lugar a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y 0,1 % de SDS. Resultarán fácilmente evidentes para los especialistas en la materia variaciones adicionales de estas condiciones. Las técnicas de hibridación son bien conocidas por los especialistas en la materia y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (*Science* 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72: 3961, 1975); Ausubel *et al.* ("Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel ("Guide to Molecular Cloning Techniques", 1987, Academic Press, Nueva York) y Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989.

60 Las moléculas de ácido nucleico útiles para hibridación en los procedimientos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que exhiba una identidad sustancial para poder hibridar específicamente con los ácidos nucleicos diana. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con una secuencia endógena son típicamente capaces de hibridar con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Se entiende por "sustancialmente idéntico" un polipéptido o molécula de ácido nucleico que exhiba al menos un 50 % de identidad con una secuencia aminoácida o secuencia de ácido nucleico de referencia. Preferiblemente, dicha secuencia es al menos un 60 %, más preferiblemente un 80 u 85 % y más preferiblemente un 90, 95 o incluso un 99 % idéntica a

5 nivel aminoacídico o de ácido nucleico a la secuencia usada para comparación. La identidad de secuencia se mide típicamente usando software de análisis de secuencia (por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Dicho software empareja las secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina y fenilalanina, tirosina. En un enfoque ejemplar para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre  $e^{-3}$  y  $e^{-100}$  que indica una secuencia estrechamente relacionada.

10 Puede usarse un sistema de detección para medir la ausencia, presencia y cantidad de hibridación para todas las distintas secuencias simultáneamente. Preferiblemente, se usa un escáner para determinar los niveles y patrones de fluorescencia.

15 Otro procedimiento para detectar variaciones de secuencia está basado en la amplificación por PCR de dianas humanas específicas y la posterior detección de su genotipo por hibridación con sondas Hairloop™ específicas punteadas sobre una micromatriz.

20 HairLoop™ es una molécula de ADN monocatenaria de tallo-bucle consistente en una secuencia de sonda embebida entre secuencias complementarias que forman un tallo de horquilla. El tallo está fijado a la superficie de la micromatriz por solo una de sus hebras. En ausencia de un ADN diana, el HairLoop™ se mantiene en estado cerrado (Fig.1a). Cuando la diana se une perfectamente (sin desapareamiento) con su HairLoop™, la mayor estabilidad del dúplex sonda-diana fuerza al tallo a desplegarse, dando como resultado la apertura del HairLoop™ (Fig. 1 b). Debido a estas propiedades estructurales y termodinámicas únicas, HairLoop™ ofrece varias ventajas sobre las sondas lineales, una de las cuales es su especificidad aumentada para diferenciar entre dos secuencias diana de ADN que difieren únicamente en un solo nucleótido.

25 HairLoop™ actúa como interruptores que están normalmente cerrados o "apagados". La unión a diana de ADN fluorescente induce cambios conformacionales que abren la estructura y, como resultado después del lavado, la fluorescencia es visible o "encendida".

30 Se diseña un HairLoop™ para ser específico de un alelo dado. Por tanto, la valoración de una mutación puntual de un marcador bialélico requiere dos HairLoop™; uno para el alelo de tipo silvestre y otro para el alelo mutante. Se dan en la Tabla 4 las secuencias específicas para la detección de los polimorfismos descritos en la Tabla 3 usando la tecnología HairLoop.



Tabla 4

SEQ ID NO:	Nombre de la variante	Secuencia que comprende el polimorfismo	Alelo	Número de acceso a dbSNP	Crom.	Posición en la crom.	Hebra
1		GGACGGG <u>I</u> GCCATGA	Riesgo	rs1801020	5	176836532	+
2	FXII, 46 C>T	GGACGGG <u>C</u> GCCATGA	Sin riesgo				
3	ABO, 261delG	CTCGTGGT <u>G</u> ACCCCCT	Riesgo	rs8176719	9	136132908	-
4		CTCGTGGT <u>_</u> ACCCCCT	Sin riesgo				
5	ABO, 526C>G	GGAGGTG <u>C</u> GCGCCT	Riesgo	rs7853989	9	136131592 +	+
6		GGAGGTG <u>G</u> GCGCCT	Sin riesgo				
7		TGCACCCC <u>G</u> GCTTCTAC	Riesgo	rs8176743	9	136131415	+
8	ABO, 703G>A	TGCACCCC <u>A</u> GCTTCTAC	Sin riesgo				
9		TCCGGAA <u>C</u> CCGTGAGC	Riesgo	rs8176750	9	136131059	+
10	ABO, 1059delC	TCCGGAA <u>_</u> CCGTGAGCG	Sin riesgo				
11	SERPINA 10, 728 C>T	CCTGCTG <u>I</u> GAAAGATCT	Riesgo	rs2232698	14	94756669	+
12		CCTGCTG <u>C</u> GAAAGATCT	Sin riesgo				
13	SERPINA C1, Ala384Ser	CGGTACTTG <u>A</u> AGCTGCTT	Riesgo	NA	1	173873176	-
14	(Cambridge II)	CGGTACTTG <u>C</u> AGCTGCTT	Sin riesgo				
15		ATTCTT <u>I</u> GCCTGTCC	Riesgo	rs6025	1	169519049	-
16	FV, R506Q (FVL Leiden)	ATTCTT <u>C</u> GCCTGTCC	Sin riesgo				
17	FV, R306T	GAAAAACCA <u>C</u> GAATCTTAAG	Riesgo	NA	1	169524537	+
18	(FV Cambridge)	GAAAAACCA <u>G</u> AATCTTAAG	Sin riesgo				
19	FV, R306G	AAGAAAAACC <u>G</u> GGAATCTTA	Riesgo	NA	1	169524536	+
20	(FV Hong Kong)	AAGAAAAACC <u>A</u> GGAATCTTA	Sin riesgo				
21		GGGCACGA <u>C</u> GCCCTGA	Riesgo	rs5985	6	6318795	-
22	FXIII, Val34Leu	GGGCACGA <u>A</u> GCCCTGA	Sin riesgo				
23	Protrombina, G20210A	TCTCAGC <u>A</u> AGCCTCAAT	Riesgo	rs179963	11	46761055	+
24		TCTCAGC <u>G</u> AGCCTCAAT	Sin riesgo				

**Procedimiento para establecer de modo más apropiado el estado de riesgo**

Es otro objeto de la presente invención el desarrollo de un algoritmo para estimar el riesgo de desarrollo y/o padecimiento de un evento tromboembólico. El algoritmo se muestra como la función 1.

Función 1

Estimación del riesgo de trombosis

La estimación individual del riesgo de trombosis está basada en un modelo de regresión logística. El objetivo de este modelo es calcular la probabilidad que tiene una persona de presentar trombosis venosa según sus características genéticas, sociodemográficas y clínicas. Para calcular esta probabilidad, se usa la siguiente ecuación:

$$\text{Probabilidad } (Y= 1|x_1, \dots, x_n) = 1 / 1 + \exp (\beta_0 + \beta_1x_1 + \dots + \beta_nx_n + \beta_{f_g}x_f \cdot x_g + \dots + \beta_{h_i}x_h \cdot x_i)$$

en la que:

- Probabilidad  $(Y= 1|x_1, \dots, x_n)$ = probabilidad de presentar una trombosis en un individuo particular con características concretas y mensurables en una serie de variables 1, ..., n. Esta probabilidad podría oscilar entre 0 y 1;
- Exp = base exponencial natural;
- $\beta_0$ = coeficiente que define el riesgo (la probabilidad) de trombosis no relacionada con las variables 1 a n. Este coeficiente puede tomar un valor de  $-\infty$  a  $+\infty$  y se calcula como el logaritmo natural de la incidencia de trombosis venosa en la población;
- $\beta_f$ = coeficiente de regresión que expresa el riesgo (mayor o menor) de presentar trombosis asociada al valor/presencia de la variable predictiva  $x_f$ . Este coeficiente puede tomar un valor de  $-\infty$  a  $+\infty$ ;
- $x_f$ = valor tomado por la variable predictiva  $x_f$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable;
- $\beta_n$ = coeficiente de regresión que expresa el riesgo (mayor o menor) de presentar trombosis asociada al valor/presencia de la variable predictiva  $x_n$ . Este coeficiente puede tomar un valor de  $-\infty$  a  $+\infty$ ;
- $x_n$ = valor tomado por la variable predictiva  $x_n$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable.

Además, el modelo incluye el efecto de la combinación de algunas variables en términos de interacción o modificación del efecto. Es decir, la magnitud el efecto (coeficiente de regresión) de una sola variable ( $x_f$ ) puede ser  $\beta_f$ , pero si esta variable está presente en combinación con otra variable ( $x_g$ ), la magnitud del efecto puede variar (aumentar o reducirse) y por lo tanto al considerar la magnitud del efecto de la variable  $x_f$  tendrá que considerarse no solo  $\beta_f$  sino también un segundo coeficiente de regresión  $\beta_{f_g}$  añadiendo  $\beta_f$  y  $\beta_{f_g}$ . Por tanto:

- $\beta_{f_g}$ = coeficiente de regresión que expresa el riesgo (mayor o menor) de presentar trombosis asociado a la presencia combinada de las variables predictivas  $x_f$  y  $x_g$ . Este coeficiente puede tomar un valor de  $-\infty$  a  $+\infty$ ;
- $x_f$ = valor tomado por la variable predictiva  $x_f$  en un individuo. El intervalo de posibles valores depende de la variable;
- $x_g$  = valor tomado por la variable predictiva  $x_g$  en un individuo. El intervalo de posibles valores depende de la variable;
- $\beta_{h_i}$  = coeficiente de regresión que expresa el riesgo (mayor o menor) de presentar trombosis asociada a la presencia combinada de las variables predictivas  $x_h$  y  $x_i$ . Este coeficiente puede tomar un valor de  $-\infty$  a  $+\infty$ ;
- $x_h$ = valor tomado por la variable predictiva  $x_h$  en un individuo. El intervalo de posibles valores depende de la variable;
- $x_i$ = valor tomado por la variable predictiva  $x_i$  en un individuo. El intervalo de posibles valores depende de la variable.

Si el paciente no presenta ninguna mutación o variante genética de riesgo pero presenta un historial familiar positivo de trombosis venosa, se incluirá esta variable en el modelo. El coeficiente de regresión de esta variable es 1,185, con un intervalo de posibles valores de 0,200 a 2,500.

Las variables incluidas en el modelo y los coeficientes de regresión de cada una de estas variables se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Variable	Exposición de riesgo	Coefficiente de regresión	Límite inferior del coeficiente de regresión	Límite superior del coeficiente de regresión
<b>Clínicas</b>				
Edad < 55 y	No	0		
55-64	Sí	0,811	0,100	3,000
65-74	Sí	1,409	0,100	3,000
75-84	Sí	1,681	0,100	3,000
>84	Sí	2,534	0,500	6,000
Hombre	Sí	0,336	0,050	1,500
Diabetes	Sí	0,351	0,050	1,500
Fumador	Sí	0,166	0,050	1,500
Índice de masa corporal < 25 kg/m <sup>2</sup>	No	0	0	0
25-29,9 kg/m <sup>2</sup>	Sí	0,412	0,050	1,500
≥30 kg/m <sup>2</sup>	Sí	0,820	0,100	3,000
Uso de anticonceptivos orales	Sí	1,131	0,100	3,000
Embarazo	Sí	1,435	0,100	3,000
Historial familiar de trombosis *	Sí	1,185	0,100	3,000
<b>Genéticos</b>				
Heterocigótico de factor V Leiden	AG	0,993	0,100	3,000
Homocigótico de factor V Leiden	AA	2,890	0,500	6,000
Protombina	AG	0,293	0,050	1,500
Serpina 10	TG	1,358	0,100	3,000
Factor XII	TC/TT	1,633	0,100	3,000
Factor XIII	GT/GG	0,198	0,050	1,500
Serpina C	TG	2,277	0,500	6,000
ABO (alelo A1)	(véase la tabla 6)	0,956	0,100	3,000
<b>Interacciones</b>				
Factor V Leiden · Protrombina	AG · AG	1,114	0,100	3,000
Factor V Leiden · ABO	AG · (véase la tabla 6)	0,599	0,100	3,000
Factor V Leiden · anticonceptivos orales	AG · Sí	0,028	0,005	1,000
Factor V Leiden · Embarazo	AG · Sí	1,191	0,100	3,000
Protombina · anticonceptivos orales	AG · Sí	0,542	0,100	3,000
Protombina · Embarazo	AG · Sí	1,673	0,100	3,000
Protombina · IMC ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>	AG · Sí	0,772	0,100	3,000
Anticonceptivos orales · IMC ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>	Sí · Sí	1,218	0,100	3,000

\* Se incluye solo en el modelo si el paciente no presente ninguna mutación ni variación genética de riesgo pero presenta un historial familiar positivo de trombosis venosa.

Tabla 6. Definición del alelo A1

5

El sujeto porta al menos un alelo A1 en el locus ABO y está presente en cualquiera de las siguientes combinaciones:

Combinación	Genotipos			
	rs8176719	rs7853989	rs8176743	rs8176750
1	GG	CC	GG	CC
2	GG	CC	GG	CdelC
3	GG	CG	GA	CG
4	GdelG	CC	GG	CG
5	GG	CG	GG	CC

5 Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluida en la presente invención y expuesta en la tabla 3 y que usa la función descrita en la función 1 ha probado ser capaz de establecer el riesgo de desarrollar una enfermedad o evento tromboembólico con una mayor exactitud que la obtenida usando los procedimientos actualmente en uso o funciones publicadas que incluyen información genética.

10 Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluida en la presente invención y expuesta en la tabla 3 y que usa la función descrita en la función 1 ha probado ser capaz de ayudar en el diagnóstico de una enfermedad o evento tromboembólico con una mayor exactitud que la obtenida usando los procedimientos actualmente en uso o funciones publicadas que incluyen información genética.

15 Mediante el uso de las funciones descritas, se obtiene un riesgo personalizado para el desarrollo de un evento tromboembólico, en particular infarto de miocardio mortal y no mortal, apoplejía, ataque isquémico transitorio, arteriopatía periférica, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar o una combinación de los mismos.

Ejemplo 1

20 Introducción. La enfermedad tromboembólica tiene un importante componente genético. Además de las clásicas FV Leiden (FVL) y G20210A de protrombina (PT), se han identificado nuevas variantes genéticas asociadas a esta patología. El objetivo de este estudio era determinar si un conjunto de variantes genéticas seleccionadas (perfil genético) mejora la capacidad de FVL y PT de predecir la presencia de trombosis.

25 Procedimientos. Se han incluido dos estudios (trombosis) y controles: MARTHA (1.150 casos/801 controles) diseñado para evaluar la asociación de FVL y PT con otros factores de riesgo, y un estudio de la población española: EP (249 casos/248 controles). El perfil genético analizado era: FVL, PT, ABO, C46T (F12), A384S (SERPINA C1), R67X (SERPINA 10). Se calculó la asociación entre variantes genéticas y trombosis usando el CP ajustado para edad y sexo. Se calculó la capacidad predictiva usando el estadístico c (AUC-ROC) y la reclasificación (NRI, IDI) observada cuando se usan FVL, PT o cuando se usa el perfil genético.

30 Resultados

35 Tabla 7: Asociación entre variantes y trombosis [CP (95 %)] y la proporción de portadores de FVL y PT en comparación con portadores del perfil genético (solo casos).

Tabla 7	FVL	PT	A1	C46T	A384S	R67X
MARTHA	2,3	0,9	1,8	0,9	0,9	2,3
	(1,8-2,8)	(0,7-1,1)	(1,2-2,7)	(0,6-1,4)	(0,2-3,7)	(1,2-4,6)
Casos	50,4		87,5			
EE	7,2	2,8	2,62	3,1	4,1	2,5
	(2,8-18,9)	(1,2-6,8)	(1,8-3,8)	(1,1-8,8)	(0,5-36,9)	(0,8-8,1)
Casos	19,7		71,5			

Tabla 8: Estadígrafo c y reclasificación NRI (*mejora de la reclasificación neta*) e IDI (*mejora de la discriminación integrada*) que compara el uso del perfil genético con FVL y PT.

Tabla 8	Estadígrafo c		NRI		IDI	
	MARTHA	EP	MARTHA	EP	MARTHA	EP
FVL+PT	0,54	0,58	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
	(0,51-0,57)	(0,56-0,62)				
FVL+PT+Resto	0,58	0,69	5,3	23,4	1	5,9
	(0,55-0,61)	(0,64-0,73)	(-1,1-11,6);	(11,1-35,6)	(0,3-1,8)	(3,71-7,88)
Valor de P	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,05	<0,001

5 Discusión. Se demuestra que el perfil genético seleccionado mejora significativamente la predicción del riesgo de trombosis, identificando un riesgo genético de presentar un evento tromboembólico en un 51,6 % de las personas que tenía un evento tromboembólico y por análisis de FVL y PT no estaban en riesgo genético. El perfil genético en la práctica clínica mejorará el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades tromboembólicas.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la valoración del riesgo de eventos tromboembólicos en un sujeto o para el diagnóstico de estar desarrollando o padeciendo una enfermedad o evento tromboembólico en un sujeto, que comprende las etapas de determinar en una muestra aislada de dicho sujeto la presencia de Arg67Stop (rs2232698) de serpina A10 (inhibidor de proteína Z), Ala384Ser (Cambridge II) de serpina C1 (antitrombina), C46T (rs1801020) de factor XII, Val34Leu (rs5985) de factor XIII, G20210A (rs1799963) de factor II (protrombina), Arg506Gln (rs6025) de factor V Leiden, Arg306Thr de factor V Cambridge, Arg306Gly de factor V Hong Kong, rs8176719 de grupo sanguíneo ABO, rs7853989 de grupo sanguíneo ABO, rs8176743 de grupo sanguíneo ABO y rs8176750 de grupo sanguíneo ABO, que es indicativa del riesgo de tener un evento tromboembólico o de estar desarrollando o pareciendo una enfermedad o evento tromboembólico, respectivamente.
2. Un procedimiento para identificar un sujeto necesitado de terapia anticoagulante y/o antitrombótica o necesitado de terapia anticoagulante y/o antitrombótica profiláctica que comprende las etapas de determinar en una muestra aislada de dicho sujeto la presencia en al menos un alelo de los polimorfismos Arg67Stop (rs2232698) de serpina A10 (inhibidor de proteína Z), Ala384Ser (Cambridge II) de serpina C1 (antitrombina), C46T (rs1801020) de factor XII, Val34Leu (rs5985) de factor XIII, G20210A (rs1799963) de factor II (protrombina), Arg506Gln (rs6025) de factor V Leiden, Arg306Thr de factor V Cambridge, Arg306Gly de factor V Hong Kong, rs8176719 de grupo sanguíneo ABO, rs7853989 de grupo sanguíneo ABO, rs8176743 de grupo sanguíneo ABO y rs8176750 de grupo sanguíneo ABO, que es indicativa de tener una respuesta reducida ante una terapia antitrombótica y/o anticoagulante o de necesitar una terapia antitrombótica y/o anticoagulante temprana y agresiva o de necesitar tratamiento antitrombótico y/o anticoagulante profiláctico.
3. Un procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende adicionalmente determinar uno o más de un factor de riesgo de enfermedad o trastorno cardiovascular o seleccionado del grupo consistente en edad, raza, sexo, índice de masa corporal, estado de tabaquismo, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, hospitalización, inmovilización por escayola, cirugía, traumatismo, anticonceptivos orales o terapia hormonal, embarazo, viaje prolongado ( $\geq 2$  horas), enfermedades vasculares del colágeno, insuficiencia cardíaca, malignidad, medicaciones, trastornos mieloproliferativos, síndrome nefrótico, pérdida recurrente de embarazos, obesidad abdominal, diabetes sacarina, nivel de colesterol-lipoproteína de baja densidad (LDL), nivel de colesterol-lipoproteína de alta densidad (HDL), nivel de colesterol, niveles de triglicéridos, historial familiar de evento tromboembólico, embarazo e índice de masa corporal.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la muestra es una muestra de tejido oral, raspado o lavado o una muestra de fluido biológico, preferiblemente saliva, orina o sangre.
5. El procedimiento según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se identifica la presencia o ausencia del polinucleótido amplificando o no consiguiendo amplificar un producto de amplificación a partir de la muestra, en el que el producto de amplificación se digiere preferiblemente con una enzima de restricción antes del análisis y/o en el que se identifica el SNP mediante hibridación de la muestra de ácido nucleico con un marcaje de cebador que es un resto detectable.
6. El procedimiento según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se identifica la presencia o ausencia del polinucleótido mediante hibridación con sondas Hairloop™ específicas de SEQ ID NO: 1 a 24 punteadas sobre una micromatriz.
7. Un procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se selecciona la enfermedad tromboembólica del grupo de infarto de miocardio mortal o no mortal, apoplejía, ataques isquémicos transitorios, arteriopatía periférica, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar o una combinación de los mismos.
8. Un programa informático o soporte informático que contiene medios para llevar a cabo un procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Figura 1a

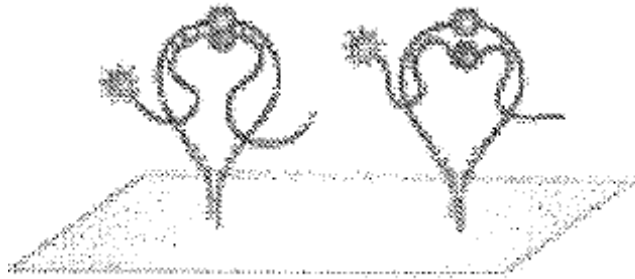


Figura 1b

