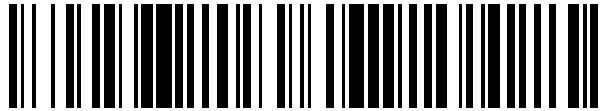


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 648**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011 E 11176695 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2554679**

54 Título: **Marcadores genéticos para la evaluación del riesgo de enfermedad cardiovascular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2016

73 Titular/es:

GENDIAG.EXE, S.L. (100.0%)

Joan XXIII, 10

08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona), ES

72 Inventor/es:

SALAS, EDUARDO;

MARRUGAR, JAUME;

ELOSUA, ROBERTO;

CASTILLO, SERGIO;

SALGADO, JOAN y

ORDOVÁS, JOSÉ MARÍA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 573 648 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

Marcadores genéticos para la evaluación del riesgo de enfermedad cardiovascular

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de enfermedades o trastornos cardiovasculares. Más específicamente, se refiere a marcadores y a métodos para determinar si un sujeto, particularmente un sujeto humano, está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno cardiovascular, desarrollar un acontecimiento cardiovascular, tener una enfermedad o trastorno cardiovascular, o experimentar una complicación de una enfermedad cardiovascular.

Antecedentes de la técnica

Enfermedad cardiovascular (CVD) es un término para enfermedades cardíacas y de los vasos sanguíneos, incluyendo (entre otras) cardiopatía isquémica (que es el tipo de CVD más común en los países industrializados; este trastorno se refiere a problemas con la circulación de la sangre al músculo cardíaco), enfermedad cerebrovascular (se refiere a problemas con la circulación de la sangre en los vasos sanguíneos del cerebro) y enfermedad vascular periférica (que afecta a la circulación principalmente en las piernas). Los sujetos con CVD pueden desarrollar varias complicaciones (denominadas a continuación en el presente documento complicaciones de CVD) incluyendo, pero sin limitarse a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios y arteriopatía periférica mortales o no mortales.

Al comienzo del siglo veinte, la enfermedad cardiovascular era responsable del 10% de todas muertes en todo el mundo. Hoy en día representa aproximadamente el 30% de todas las muertes y el 80% de estas muertes se produce en países en vías de desarrollo. La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en los EE.UU. y Europa. La enfermedad cardiovascular, además de ser la principal causa de muerte, es una enfermedad altamente prevalente que produce altos costes de atención sanitaria.

Desde el punto de vista de la salud pública, la política que ha de desarrollarse en relación con la enfermedad cardiovascular debe buscar reducir el riesgo para la población de desarrollar enfermedad cardiovascular (Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo 2004 – Cambiemos el rumbo de la historia. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2004). A este efecto, la estratificación de la población en relación con su riesgo cardiovascular permitiría el establecimiento de medidas preventivas para prevenir o retrasar el comienzo de la enfermedad. La estratificación también ayudaría en el establecimiento de un tratamiento para sujetos aquejados mejorando la eficacia (evitando la aparición de acontecimientos y complicaciones cardiovasculares) y la rentabilidad (Organización Mundial de la Salud. Informe de salud en el mundo 2004 – Cambiemos el rumbo de la historia. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2004; Bakhai A. The burden of coronary, cerebrovascular and peripheral arterial disease. *PharmacoEconomics* 2004; 22 (Supl 4):11-18.).

Desde el estudio del corazón de Framingham (Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, *et al.* *Circulation* 1988; 97:1837-1847; Grundy Sm, Balady GJ, Criqui MH, *et al.* *Circulation* 1988; 97:1876-1887) se acepta que la existencia de factores de riesgo tales como dislipidemia (principalmente la elevación del colesterol LDL), hipertensión, diabetes, consumo de tabaco y estilo de vida sedentario son causas directas de la enfermedad coronaria. Estos factores de riesgo son comunes en la población y el estudio INTERHEART ha mostrado que son universales, lo que significa que estos factores de riesgo son los mismos en casi todas las regiones geográficas y en todos los grupos raciales/étnicos en todo el mundo, también son constantes en hombres y mujeres.

La identificación de estos factores de riesgo ha permitido a los científicos desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas. Diferentes estudios (Sanz G, Fuster V. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009; 2:101-110) entre otros, el MONICA de la OMS (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease, monitorización de tendencias y determinantes en enfermedad cardiovascular) (WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol.* 1988; 41:105-14) y el estudio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities, riesgo de aterosclerosis en comunidades) (Rosamond WD, Chambless LE, Folsom A, *et al.* *N Engl J Med.* 1998; 339:861-7) han demostrado que se trata de medidas eficaces.

En los años noventa del siglo veinte, se desarrolló el concepto de que la intensidad de las medidas preventivas-de tratamiento contra los factores de riesgo debe ajustarse a la gravedad del riesgo (Grundy Sc, Bazzarre T, Cleeman J, *et al.* *Circulation* 2000; 101:e3-e11). Este concepto se propuso por primera vez en el Adult Treatment Panel Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) y se conformó en su segundo informe. Se propuso un enfoque similar en la recomendación conjunta de la Sociedad Europea de Cardiología, la Sociedad Europea de Arteriosclerosis y la Sociedad Europea de Hipertensión (Word D, De Backer G, Faergeman O, Gram. I, Mancina G, Pyorala K. *Atherosclerosis* 1998; 140:199-270). La idoneidad de las medidas contra el riesgo es importante porque constituyen una herramienta importante para lograr un equilibrio apropiado entre eficacia, seguridad y coste de la terapia.

Antes de esta invención, tal como se describe a continuación en el presente documento, los médicos estimaban el

riesgo de enfermedad cardiovascular del paciente en cinco y diez años basándose en ecuaciones de regresión de múltiples variables derivadas de las cohortes de Framingham en las que los niveles de factores de riesgo tradicionales (edad, colesterol total, colesterol-proteínas de alta densidad, tensión arterial sistólica, estado de tabaquismo) son ponderaciones asignadas (puntos) para predecir acontecimientos de cardiopatía coronaria (CHD), de manera separada para hombres y mujeres (Grundt Sm, Balady GJ, Criqui MH, *et al.* *Circulation* 1988; 97:1876-1887). Entonces se convertía la puntuación de riesgo calculada en una probabilidad absoluta de desarrollar CHD dentro del intervalo de tiempo.

Se han desarrollado diversas escalas/métodos para la estimación del riesgo cardiovascular en Europea: la escala Prospective Cardiovascular Munster (escala cardiovascular prospectiva de Munster) (PROCAM), que estima el riesgo de complicaciones cardiovasculares, el proyecto European Systematic Coronary Risk Evaluation (proyecto europeo de evaluación de riesgo coronario sistemático) (SCORE), que estima el riesgo de muerte cardiovascular y el Registro Gironi del Cor [un registro cardíaco desarrollado en Gerona] (REGICOR) que estima el riesgo de infarto de miocardio o angina de pecho.

Aunque se reconoce la utilidad de las escalas/métodos para calcular el riesgo cardiovascular y pese a todos los esfuerzos en la estimación del riesgo cardiovascular en todos los pacientes (Greenland P, *et al.* *Circulation* 2001; 104:1863-1867), se produce un número significativo de acontecimientos cardiovasculares en pacientes asintomáticos con un riesgo "intermedio" calculado usando las herramientas en uso hoy en día para la estimación del riesgo cardiovascular (Greenland P, *et al.* *Circulation* 2001; 104:1863-1867, Smith SC Jr. *Am J Cardiol* 2006; 97 [Supl]:28A-32A, Marrugat J, *et al.* *J Epidemiol Community Health* 2007; 61:40-47).

Por tanto, los sujetos con riesgo cardiovascular intermedio se beneficiarían más del uso de pruebas que permitieran una estratificación del riesgo más precisa. Además, si estas pruebas fueran factibles, prácticas y eficaces para una definición más precisa del riesgo cardiovascular y/o la motivación para un cambio eficaz hacia un estilo de vida más sano desde el punto de vista cardiovascular (Greenland P, *et al.* *Circulation* 2001; 104:1863-1867, Smith SC Jr. *Am J Cardiol* 2006; 97 [Supl]:28A-32A), esto significaría una mejora significativa con respecto a la situación actual.

Se han seguido varias estrategias para resolver esta limitación de las escalas/métodos en uso hoy en día para calcular el riesgo cardiovascular.

En los últimos años diversos estudios han evaluado si añadir información sobre nuevos factores de riesgo tales como los descritos por Wang mejoran la capacidad de predicción, pero los resultados han sido desalentadores (Wang TJ, Gona P, Larson MG, *et al.* *N Engl J Med.* 2006; 355(25):2631-9).

Una fuente adicional de información que puede mejorar la capacidad de predicción de los algoritmos para determinar el cálculo de riesgo cardiovascular es la variabilidad genética del individuo. Se conoce bien que hay una agregación familiar en la aparición de enfermedad cardiovascular, lo que sugiere la presencia de factores genéticos que modulan la propensión del individuo. En los últimos años, se ha estimado que la heredabilidad (proporción de variabilidad fenotípica atribuible a los genes) de mortalidad por cardiopatía isquémica es desde 0,53 hasta 0,57 y que para el comienzo de un infarto de miocardio es de 0,56.

También se conoce que la cardiopatía isquémica no está relacionada con un único gen sino con muchos genes que determinan la propensión genética del individuo. En este contexto, cardiopatía coronaria se define como una enfermedad compleja que implica múltiples genes, múltiples variantes genéticas en cada uno de estos genes y factores medioambientales, con interacciones complejas entre las que se determinará en última instancia la propensión del individuo a esta enfermedad.

Avances tecnológicos recientes han permitido la publicación de la secuencia del genoma humano, la disponibilidad de bases de datos públicas con millones de polimorfismos (SNP), la mejora de los métodos de genotipado con una reducción del coste analítico y el conocimiento de los patrones de desequilibrio de ligamiento en el genoma humano. Como resultado de todos estos logros, hay un interés aumentado y oportunidades para estudiar la genética de enfermedades incluso complejas.

Sin embargo, la identificación y la selección de marcadores genéticos para constituir una combinación específica de este tipo que mejorarán realmente la predicción de riesgo cardiovascular no es una tarea fácil. Se han realizado varios intentos. Ya hay algunos estudios de cohorte que han incluido una variante genética en el cromosoma 9p21 en las funciones de riesgo, pero sin observar una mejora significativa en la capacidad de discriminación de modelos predictivos (Paynter NP, Chassman DI, Palmieri J, *et al.* *Ann Intern Med* 2009; 150:65-72). Otros estudios han incluido una puntuación de riesgo genético basándose en el número de alelos de riesgo acumulados en un individuo con el fin de aumentar la magnitud de la asociación observada. Morrison *et al.* (Morrison AC, *et al.* *Am J Epidemiol* 2007; 166:28-35) compararon el área bajo la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) usando la puntuación de riesgo cardiovascular desarrollada por miembros del estudio Atherosclerosis Risk in Communities (ACRS) frente al área obtenida combinando la puntuación con la puntuación de riesgo ACRS genético (GRS). El área bajo la curva estaba aumentada de manera ligera pero no significativa tanto en la población blanca desde 0,764 hasta 0,769 (ACRS frente a ACRS + GRS) como desde 0,758 hasta 0,769 en la población negra.

El documento WO 2012/142713 divulga un método de evaluación del riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular que comprende determinar un conjunto de SNP que comprende los SNP definidos por la presente SEQ ID NO: 1 a 7.

5 Por tanto, aunque se han realizado varios intentos para resolver la limitación descrita anteriormente de las escalas/métodos en uso hoy en día para calcular el riesgo cardiovascular, este objetivo todavía no se ha logrado.

10 Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos marcadores, incluyendo nuevos marcadores genéticos y combinaciones específicas de los mismos que predigan de manera satisfactoria y ventajosa quién, especialmente los que se ha predicho que tienen un riesgo moderado o intermedio según las escalas/métodos en uso hoy en día, presenta en realidad un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y/o complicaciones de enfermedad cardiovascular tales como (pero sin limitarse a) infarto de miocardio o angina de pecho o accidente isquémico transitorio o accidente cerebrovascular o arteriopatía periférica mortal o no mortal de manera que puedan implementarse medidas preventivas para mantener el riesgo en el nivel más bajo posible.

15 Además de los sujetos clasificados como en riesgo moderado, existe otro grupo de sujetos en los que las escalas/métodos en uso hoy en día son incapaces de proporcionar una buena estimación de su riesgo cardiovascular; las personas jóvenes (hombres <45 años y mujeres <65) porque debido a su juventud se les asigna un bajo riesgo cardiovascular, independientemente de la presencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos en los sujetos (Cooney MT, Dudita AL, Graham IM. J Am Coll Cardiol 2009; 54:1209-1227).

20 Por tanto, pese a varios intentos para resolver la limitación descrita anteriormente de las escalas/métodos en uso hoy en día para calcular el riesgo cardiovascular, este objetivo todavía no se ha logrado. Por consiguiente, también existe la necesidad de nuevos marcadores, incluyendo nuevos marcadores genéticos y combinaciones de los mismos que puedan predecir de manera satisfactoria y ventajosa quién presenta un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y/o complicaciones de enfermedad cardiovascular tales como (pero sin limitarse a) infarto de miocardio o angina de pecho o accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica mortal o no mortal en personas jóvenes, de manera que puedan implementarse medidas preventivas para mantener el riesgo en el nivel más bajo posible.

Sumario de la invención

25 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas 1-9.

30 En un primer aspecto, la divulgación proporciona un método que es adecuado para resolver las limitaciones de las escalas/métodos en uso hoy en día para calcular el riesgo cardiovascular, concretamente que un número significativo de acontecimientos cardiovasculares se producen en pacientes con un riesgo intermedio calculado usando las herramientas en uso hoy en día para la estimación del riesgo cardiovascular y que la estimación del riesgo cardiovascular es inexacta en sujetos jóvenes.

35 El método proporcionado según la presente divulgación resuelve las limitaciones mencionadas anteriormente mediante la evaluación mejorada del riesgo cardiovascular o mediante la (re)clasificación del sujeto en un estado de riesgo (más apropiado) de tener una enfermedad o trastorno cardiovascular y/o complicaciones tales como (pero sin limitarse a) infarto de miocardio, angina de pecho, accidente cerebrovascular y/o arteriopatía periférica mortales o no mortales en comparación con los métodos en uso hoy en día y que comprende las etapas de determinar en una muestra aislada de dicho sujeto la presencia en al menos un alelo de polimorfismos en la posición 27 dentro de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 34, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, G en SEQ ID NO: 8, A en SEQ ID NO: 9, A en SEQ ID NO: 10, A en SEQ ID NO: 11, G en SEQ ID NO: 12, A en SEQ ID NO: 13, C en SEQ ID NO: 14, G en SEQ ID NO: 15, A en SEQ ID NO: 16, A en SEQ ID NO: 17, G en SEQ ID NO: 18, C en SEQ ID NO: 19, T en SEQ ID NO: 20, A en SEQ ID NO: 21, G en SEQ ID NO: 22, C en SEQ ID NO: 23, C en SEQ ID NO: 24, G en SEQ ID NO: 25, C en SEQ ID NO: 26, A en SEQ ID NO: 27, C en SEQ ID NO: 28, G en SEQ ID NO: 29, T en SEQ ID NO: 30, T en SEQ ID NO: 31, C en SEQ ID NO: 32, C en SEQ ID NO: 33 y/o C en SEQ ID NO: 34 es indicativa de un riesgo de padecer un acontecimiento cardiovascular (infarto de miocardio agudo o angina de pecho o accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica mortal o no mortal) en los siguientes diez años, que es mejor que la evaluación de riesgo realizada por las escalas/métodos en uso hoy en día considerando sólo los factores de riesgo clásicos.

40 “Evaluación mejorada del riesgo cardiovascular” en el contexto de esta solicitud debe entenderse como una predicción de la probabilidad de desarrollar un acontecimiento cardiovascular que se ajusta mejor que la evaluación de riesgo realizada por escalas/métodos en uso hoy en día, tales como pero sin limitarse a puntuación de riesgo de Framingham, puntuación de riesgo de Framingham adaptada (tal como pero sin limitarse a Regicor), Score, HeartScore, Procam, Reynolds y QRisk, con el número de acontecimientos que ha padecido (dentro del contexto de un estudio retrospectivo) o padecerá un paciente particular. La mejora puede medirse como un aumento en el área bajo la curva ROC, o como un valor estadístico c mayor tal como se mide por ejemplo calculando el índice de

concordancia usando la función `rcorr.cens` del paquete R `H-misc`.

“Evaluación mejorada del riesgo cardiovascular” en el contexto de esta solicitud se usa de manera intercambiable con “evaluación refinada del riesgo cardiovascular”.

5 “(Re)clasificación del sujeto a un estado de riesgo (más apropiado)” en el contexto de esta solicitud debe entenderse como una estratificación más precisa del individuo en una categoría de riesgo superior o inferior de importancia clínica tal como se define por Nancy R. Cook (Cook NR. Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction. *Circulation* 2007; 115: 928-935. La bondad de la (re)clasificación puede medirse mediante la mejora de reclasificación neta (Pencina MJ, D’Agostino RB, Sr., Steyerberg EW. Extensions of net reclassification calculations to measure usefulness of new biomarkers. *StatMed*. 2011; 486 30(1):11-21, y/o mediante la mejora de discriminación integrada (Chambless LE, Cummiskey CP, Cui G. Several methods to assess improvement in risk prediction models: Extension to survival analysis. *Stat Med*. 2011; 30(1):22-38.

15 Para calcular el número de acontecimientos esperados en 10 años en cada categoría de riesgo y en cada cohorte, pueden usarse las estimaciones de Kaplan-Meier. Steyerberg EW, Pencina MJ. Reclassification calculations for persons with incomplete follow-up. *Ann Intern. Med*. 2010; 152(3):195-196, que se incluye en el presente documento como referencia en su totalidad. Para evaluar la bondad de ajuste de los modelos, puede usarse una versión de la prueba de Hosmer-173. Véase también D’Agostino RB, Nam BH. Evaluation of the Performance of Survival Analysis Models: Discrimination and Calibration Measures. *Handbook of Statistics*. 2003; Vol.23: 1-25, que se incluye en el presente documento como referencia en su totalidad y Newson R. Confidence intervals for Rank statistics: Somers’ D and extensions. *StataJournal*. 2006; 6:309-334.

25 Cualquiera de los presentes métodos, tal como se describe por toda esta solicitud, está en una realización preferida llevada a cabo *ex vivo*.

30 En una realización preferida, se determina la presencia de los siguientes alelos de polimorfismos: polimorfismos en la posición 27 dentro de secuencias específicas de ácido nucleico, en particular la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, G en SEQ ID NO: 8, A en SEQ ID NO: 9, A en SEQ ID NO: 10, G en SEQ ID NO: 12 y A en SEQ ID NO: 16.

35 En una realización preferida, se determina la presencia de los siguientes alelos de polimorfismos: polimorfismos en la posición 27 dentro de secuencias específicas de ácido nucleico, en particular la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, G en SEQ ID NO: 8 y A en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10, G en SEQ ID NO: 12 y A en SEQ ID NO: 16, formando las cuatro últimas el haplotipo B de ALOX5AP y considerándose como un componente de riesgo genético además de las otras 8 secuencias.

40 En un aspecto preferido, se determina la presencia de los siguientes alelos de polimorfismos: polimorfismos en la posición 27 dentro de las secuencias específicas de ácido nucleico, en particular la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7 y G en SEQ ID NO: 8.

45 En un aspecto preferido, se determina la presencia de los siguientes alelos de polimorfismos: polimorfismos en la posición 27 dentro de las secuencias específicas de ácido nucleico, en particular la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 5 y G en SEQ ID NO: 8.

50 Estas realizaciones, es decir combinaciones específicas de SNP son aspectos preferidos de esta divulgación descrita a continuación.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para la reclasificación de la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina de pecho o accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica mortal o no mortal en un periodo de diez años y/o un periodo de larga duración basándose en la presencia de los polimorfismos enumerados en las reivindicaciones en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, en los que la contribución relativa de los polimorfismos se facilita como una puntuación de riesgo genético.

60 “Acontecimiento cardiovascular” en el contexto de esta solicitud se usa de manera intercambiable con “complicación, enfermedad o trastorno cardiovascular”.

“AHA” en el contexto de esta solicitud debe entenderse como American Heart Association (Asociación estadounidense del corazón).

65 “GWAS” en el contexto de esta solicitud debe entenderse como estudios de asociación del genoma completo.

El término “enfermedad” y “trastorno” se interpretarán en el contexto de esta solicitud de manera intercambiable.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos para la reclasificación de la probabilidad de que un individuo clasificado como que tiene un riesgo moderado padezca un acontecimiento cardiovascular (infarto de miocardio o angina de pecho o accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica mortal o no mortal) en un periodo de diez años y/o un periodo de larga duración según los métodos en uso hoy en día basándose en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, en los que la contribución relativa de los polimorfismos se facilita como una puntuación de riesgo genético.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos para la reclasificación de la probabilidad de que un individuo joven padezca un acontecimiento cardiovascular (infarto de miocardio o angina de pecho o accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica mortal o no mortal) en un periodo de diez años y/o un periodo de larga duración calculado según los métodos en uso hoy en día basándose en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, en los que la contribución relativa de los polimorfismos se facilita como una puntuación de riesgo genético.

En aspectos adicionales, la divulgación se refiere a métodos para la determinación de la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina de pecho o accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica mortal o no mortal en un periodo de diez años o en un periodo de larga duración basándose en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, en los que la contribución relativa de los polimorfismos se facilita como una puntuación de riesgo genético.

En aspectos adicionales, la divulgación se refiere a métodos para la determinación de la probabilidad de que un individuo joven presente un infarto de miocardio o angina de pecho o accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio o arteriopatía periférica mortal o no mortal en un periodo de 10 años o en un periodo de larga duración basándose en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, en los que la contribución relativa de los polimorfismos se facilita como una puntuación de riesgo genético.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Aún en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 dentro de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1 a 34.

Aún en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 dentro de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 16.

Aún en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 dentro de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y considerándose la siguiente SEQ ID NO: 9, 10, 12 y 16 como haplotipo B de ALOX5AP y considerándose los alelos AAAG en esas secuencias como un único alelo de riesgo.

Aún en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 dentro de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Aún en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 dentro de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 2, 3, 5 y 8.

Descripción detallada de la invención

La presente invención también se explica adicionalmente mediante las siguientes figuras:

Figura 1: Análisis de CVD REGICOR, puntuación de riesgo genético, incidencia de acontecimientos cardiovasculares (a) y coronarios (b).

Figura 2: Tabla 1 – resumen de SNP

Figura 3: Tabla G - Características fenotípicas de los participantes

- Los autores de la presente solicitud han resuelto dos problemas identificados anteriormente en las escalas/métodos en uso hoy en día para el cálculo del riesgo de que un sujeto desarrolle enfermedad cardiovascular, acontecimientos cardiovasculares y complicaciones cardiovasculares incluyendo, pero sin limitarse a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios y arteriopatía periférica mortales y no mortales.
- Por tanto, la presente solicitud también se refiere a un método para resolver la limitación de las escalas/métodos mediante los cuales un número significativo de acontecimientos cardiovasculares se producen en sujetos con un riesgo intermedio calculado usando las herramientas en uso hoy en día para la estimación del riesgo cardiovascular y/o para resolver la limitación de las escalas/métodos mediante los cuales los sujetos jóvenes obtienen un riesgo cardiovascular bajo poco realista.
- La presente solicitud resuelve la limitación descrita anteriormente de las escalas/métodos usados hoy en día para calcular el riesgo cardiovascular proporcionando un método para reclasificar a los pacientes en un estado de riesgo más apropiado. Se usa una combinación particular (tal como se describió anteriormente) de marcadores genéticos, especialmente la combinación tal como se enumera en la tabla 1 (véase la figura 2), seleccionada y evaluada por los inventores tras un análisis complejo y genuino de miles de posibles marcadores. De las diferentes posibilidades para obtener una puntuación de riesgo genético (GRS), los inventores han tenido éxito en identificar una particular, mediante la cual esta combinación proporcionó los mejores resultados posibles. Para calcular la puntuación de riesgo genético, se considera el número acumulado de alelo de riesgo de los SNP enumerados en la tabla 1 que están presentes en cada individuo. Para cada una de las variantes estudiadas, cada individuo puede tener 0, 1 ó 2 alelos de riesgo. Habiéndose calculado el sumatorio de alelos de riesgo acumulados en el conjunto diferente de las variantes seleccionadas (n=34, 12, 9, 8 ó 4), para cada individuo se facilitó una puntuación que podría ir desde 0 hasta 68, 24, 18, 16 u 8, respectivamente. Los inventores han generado nuevos algoritmos para la estimación del riesgo cardiovascular. Esta estrategia innovadora permite la reclasificación de los pacientes con valores de mejora de reclasificación neta excelentes.
- Todos los valores tal como se obtienen en la(s) función/funciones se adaptarán a la prevalencia regional o nacional, si es necesario.
- Los términos “polimorfismo” y “polimorfismo de un solo nucleótido” (es decir SNP) se usan en el presente documento de manera intercambiable y se refieren a una variación de la secuencia de nucleótidos que se produce cuando un solo nucleótido en el genoma u otra secuencia compartida difiere entre miembros de especies o entre cromosomas emparejados en un individuo. Un SNP también puede designarse como una mutación con frecuencia alélica baja mayor de aproximadamente el 1% en una población definida. El polimorfismo de un solo nucleótidos según la presente solicitud puede caer dentro de secuencias de genes codificantes, regiones de genes no codificantes o las regiones intrónicas entre genes.
- La lista de polimorfismos que se usan en este método de la presente invención se facilita en la tabla 1, incluida en el presente documento como la figura 2.
- El término “enfermedad o trastorno cardiovascular”, tal como se usa en el presente documento, incluye enfermedades que afectan al corazón o los vasos sanguíneos o a ambos o que están asociadas con los sistemas cardiopulmonar y circulatorio incluyendo (pero sin limitarse a) isquemia, angina de pecho, estados edematosos, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, oxidación de LDL, adhesión de monocitos a células endoteliales, formación de células espumosas, desarrollo de estría grasa, adherencia y agregación de plaquetas, proliferación de células de músculo liso, lesión por reperfusión, tensión arterial alta, enfermedad trombótica, arritmia (auricular o ventricular o ambas); alteraciones del ritmo cardíaco; isquemia de miocardio; infarto de miocardio; aneurisma cardíaco o vascular; vasculitis, accidente cerebrovascular; arteriopatía obstructiva periférica de una extremidad, un órgano o un tejido; lesión por reperfusión tras isquemia del cerebro, el corazón u otro órgano o tejido, choque endotóxico, quirúrgico o traumático; hipertensión, valvulopatía, insuficiencia cardíaca, tensión arterial anómala; choque; vasoconstricción (incluyendo la asociada con migrañas); anomalía vascular, inflamación y/o insuficiencia limitada a un único órgano o tejido.
- En una realización preferida, la enfermedad cardiovascular o el acontecimiento cardiovascular cuyo riesgo va a detectarse se selecciona del grupo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, arteriopatía periférica mortales y no mortales o una combinación de los mismos.
- El término “muestra”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra procedente de una fuente biológica e incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos, material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos de los mismos, y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.
- Cuando se usan modelos de predicción, como por ejemplo, para tomar decisiones sobre el tratamiento, los riesgos

predictivos se clasifican usando umbrales de punto de corte de riesgo. El término “reclasificación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la asignación de una persona a otra categoría de riesgo según un nuevo modelo en comparación con el modelo inicial de evaluación de riesgo. Habitualmente se denomina reclasificación al porcentaje de personas que están reclasificándose.

El término “mejora de reclasificación neta (NRI)” tal como se usa en el presente documento, se refiere a la evaluación de la mejora neta en la clasificación de riesgo. La NRI se calcula como la suma de las diferencias en la proporción de individuos que sube menos la proporción que baja para los casos y la proporción de individuos que baja menos la proporción que sube para los no casos. Los componentes de NRI indican el beneficio neto de mejora de reclasificación en casos y no casos. Los valores positivos y negativos representan el porcentaje neto de individuos con clasificación mejorada o peor, respectivamente. En general, la mejora en la reclasificación se indica mediante una NRI significativamente superior a 0.

El término “terapia cardiovascular”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de tratamiento que da como resultado la mejora o reduce el riesgo de padecer cualquiera de las enfermedades cardiovasculares mencionadas anteriormente. Las terapias adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes trombolíticos, antitrombóticos, agentes antiarrítmicos, agentes que prolongan la repolarización, agentes antihipertensores, vasodilatores, antihipertensores, diuréticos, agentes ionotrópicos, agentes antianginosos y similares.

Los ejemplos no limitativos de anticoagulantes incluyen acenocumarol, ancrod, anisindiona, bromindiona, clorindiona, cumetarol, ciclocumarol, sulfato sódico de dextrano, dicumarol, difenadiona, biscumacetato de etilo, etilidencumarol, fluindiona, heparina, hirudina, liapolato sódico, oxazidiona, polisulfato de pentosano, fenindiona, fenprocumón, fosvitina, picotamida, tiocloamarol y warfarina.

Los ejemplos no limitativos de agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, un dextrano, dipiridamol (Persantin), heparina, sulfipiranona (Anturane), clopidrogel y ticlopidina (Ticlid). Los ejemplos no limitativos de agentes trombolíticos incluyen activador de plasminógeno tisular (Activase), plasmina, pro-urocinasa, urocinasa (Abbokinase) estreptocinase (Streptase), anistreplasa/APSAC (Eminase).

En determinadas realizaciones en las que un paciente está padeciendo una hemorragia o tiene una posibilidad aumentada de padecer hemorragia, puede usarse un agente que puede potenciar la coagulación sanguínea. Los ejemplos no limitativos de agentes que promueven la coagulación sanguínea incluyen antagonistas de agentes trombolíticos y antagonistas de anticoagulantes. Los ejemplos no limitativos de antagonistas de anticoagulantes incluyen protamina y vitamina K1.

Los ejemplos no limitativos de antagonistas de agentes trombolíticos incluyen ácido aminocaproico (Amicar) y ácido tranexámico (Amstat). Los ejemplos no limitativos de antitrombóticos incluyen anagrelida, argatrobán, cilstazol, daltrobán, defibrotida, enoxaparina, fraxiparina, indobufeno, lamoparán, ozagrel, picotamida, plafibrada, tedelparina, ticlopidina y triflusal.

Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos incluyen agentes antiarrítmicos de clase I (bloqueantes de los canales de sodio), agentes antiarrítmicos de clase II (bloqueantes beta-adrenérgicos), agentes antiarrítmicos de clase III (fármacos que prolongan la repolarización), agentes antiarrítmicos de clase IV (bloqueantes de los canales de calcio) y agentes antiarrítmicos diversos.

Los ejemplos no limitativos de bloqueantes de los canales de sodio incluyen agentes antiarrítmicos de clase IA, clase IB y clase IC. Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IA incluyen dispiramida (Norpace), procainamida (Pronestil) y quinidina (Quinidex). Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IB incluyen lidocaína (Xylocaine), tocainida (Tonocard) y mexiletina (Mexitil). Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IC incluyen encainida (Enkaid) y flecainida (Tambocor).

Los ejemplos no limitativos de beta-bloqueantes, conocidos de otro modo como bloqueantes beta-adrenérgicos, antagonistas beta-adrenérgicos o agentes antiarrítmicos de clase II, incluyen acebutolol (Sectral), alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, clorhidrato de butidrina, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, esmolol (Brevibloc), indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nadoxolol, nifenalol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propanolol (Inderal), sotalol (Betapace), sulfinalol, talinolol, tertatolol, timolol, toliprolol y xibinolol. En determinadas realizaciones, el beta-bloqueante comprende un derivado de ariloxipropanolamina. Los ejemplos no limitativos de derivados de ariloxipropanolamina incluyen acebutolol, alprenolol, arotinolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bunitrolol, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, epanolol, indenolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propanolol, talinolol, tertatolol, timolol y toliprolol.

Los ejemplos no limitativos de agentes con capacidades hipolipémicas incluyen, sin limitación, secuestrantes de

ácidos biliares tales como aminas cuaternarias (por ejemplo colestiramina y colestipol); ácido nicotínico y sus derivados; inhibidores de HMG-CoA reductasa tales como mevastatina, pravastatina y simvastatina; gemfibrozil y otros ácidos fíbricos, tales como clofibrato, fenofibrato, benzafibrato y cipofibrato; probucol; raloxifeno y sus derivados.

5 Los ejemplos no limitativos de agentes que prolongan la repolarización, también conocidos como agentes antiarrítmicos de clase III, incluyen amiodarona (Cordarone) y sotalol (Betapace).

10 Los ejemplos no limitativos de bloqueantes de los canales de calcio, conocidos de otro modo como agentes antiarrítmicos de clase IV, incluyen una arilalquilamina (por ejemplo, bepridil, diltiazem, fendilina, galopamilol, prenilamina, terodilina, verapamilol), un derivado de dihidropiridina (felodipino, isradipino, nifedipino, nimodipino, nisoldipino, nitrendipino), un derivado de piperazinida (por ejemplo, cinarizina, flunarizina, lidoflazina) o un bloqueante de los canales de calcio diverso tal como benciclano, etafenona, magnesio, mibefradilo o perhexilina. En determinadas realizaciones un bloqueante de los canales de calcio comprende un antagonista de calcio de dihidropiridina de acción prolongada (de tipo nifedipino).

15 Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos diversos incluyen adenosina (Adenocard), digoxina (Lanoxin), acecainida, ajmalina, amproxano, aprindina, tosilato de bretilio, bunaftina, butobendina, ácido capobénico, cifenlina, disopiranida, hidroquinidina, indecainida, bromuro de ipatropio, lidocaína, lorajmina, lorcainida, meobentina, moricizina, pirmenol, prajmalina, propafenona, pirinolina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina y viquidil.

20 Los ejemplos no limitativos de agentes antihipertensores incluyen simpaticolíticos, alfa/beta-bloqueantes, alfa-bloqueantes, agentes de anti-angiotensina II, beta-bloqueantes, bloqueantes de los canales de calcio, vasodilatadores y antihipertensores diversos.

25 Los ejemplos no limitativos de alfa-bloqueantes, también conocidos como bloqueantes alfa-adrenérgicos o un agonista alfa-adrenérgico, incluyen amosulalol, arotinolol, dapiprazol, doxazosina, mesilatos de ergoloide, fenspirida, indoramina, labetalol, nicergolina, prazosina, terazosina, tolazolina, trimazosina y yohimbina. En determinadas realizaciones, un bloqueante puede comprender un derivado de quinazolina. Los ejemplos no limitativos de derivados de quinazolina incluyen atfuzosina, bunazosina, doxazosina, prazosina, terazosina y trimazosina. En determinadas realizaciones, un agente antihipertensor es un antagonista tanto alfa como beta-adrenérgico. Los ejemplos no limitativos de un bloqueante alfa/beta comprenden labetalol (Normodyne, Trandate).

30 Los ejemplos no limitativos de agentes anti-angiotensina II incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas del receptor de angiotensina II. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de la ACE) incluyen alacepril, enalapril (Vasotec), captopril, cilazapril, delapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril y ramipril. Los ejemplos no limitativos de bloqueantes del receptor de angiotensina II, también conocidos como antagonistas del receptor de angiotensina II, bloqueantes del receptor de ANG o bloqueantes del receptor de ANG-II tipo 1 (ARBS), incluyen angiocandesartán, eprosartán, irbesartán, losartán y valsartán. Los ejemplos no limitativos de simpaticolíticos incluyen simpaticolíticos de acción central o simpaticolíticos de acción periférica. Los ejemplos no limitativos de simpaticolíticos de acción central, también conocidos como simpaticolíticos del sistema nervioso central (SNC), incluyen clonidina (Catapres), guanabenz (Wytensin), guanfacina (Tenex) y metildopa (Aldomet). Los ejemplos no limitativos de un simpaticolítico de acción periférica incluyen agentes bloqueantes ganglionares, un agente bloqueante de neuronas adrenérgicas, un agente bloqueante beta-adrenérgico o un agente bloqueante alfa-adrenérgico. Los ejemplos no limitativos de agentes bloqueantes ganglionares incluyen mecamilamina (Inversine) y trimetafán (Arfonad). Los ejemplos no limitativos de agentes bloqueantes de neuronas adrenérgicas incluyen guanetidina (Ismelin) y reserpina (Serpasil). Los ejemplos no limitativos de bloqueantes beta-adrenérgicos incluyen acenitolol (Sectral), atenolol (Tenormin), betaxolol (Kerlone), carteolol (Cartrol), labetalol (Normodyne, Trandate), metoprolol (Lopressor), nadanol (Corgard), penbutolol (Levator), pindolol (Visken), propranolol (Inderal) y timolol (Blocadren). Los ejemplos no limitativos de bloqueantes alfa-adrenérgicos incluyen prazosin (Minipress), doxazocin (Cardura) y terazosin (Hytrin).

35 En determinadas realizaciones, un agente terapéutico cardiovascular puede comprender un vasodilatador (por ejemplo, un vasodilatador cerebral, un vasodilatador coronario o un vasodilatador periférico). En determinadas realizaciones preferidas, un vasodilatador comprende un vasodilatador coronario. Los ejemplos no limitativos de vasodilatadores coronarios incluyen amotrifeno, bendazol, hemisuccinato de benfurodilol, benciodarona, cloracizina, cromonar, clobenfulol, clonitrato, dilazep, dipiridamol, droprenilamina, efloxato, tetranitrato de eritrilito, etafenona, fendilina, floredil, ganglefeno, herestrof bis(beta-dietilaminoetil éter), hexobendina, tosilato de itramina, kelina, lidoflanina, manitol hexanitratona, medibazina, nicorglicerina, pentaeritritol tetranitrato, pentrinitrol, perhexilina, pimefilina, trapidil, tricromilo, trimetazidina, fosfato de trolnitrato y visnadina.

40 En determinadas realizaciones, un vasodilatador puede comprender un vasodilatador de terapia crónica o un vasodilatador hipertensor de emergencia. Los ejemplos no limitativos de un vasodilatador de terapia crónica incluyen hidralazina (Apresoline) y minoxidil (Loniten). Los ejemplos no limitativos de un vasodilatador hipertensor de emergencia incluyen nitroprusiato (Nipride), diazoxida (Hiperstat IV), hidralazina (Apresoline), minoxidil (Loniten) y

verapamilo.

Los ejemplos no limitativos de antihipertensores diversos incluyen ajmalina, ácido gamma-aminobutírico, bufeniode, cicletainina, ciclosidomina, un tanato de criptenamina, fenoldopam, flosequinan, ketanserina, mebutamato, mecamilamina, metildopa, metil-4-piridil-cetona-tiosemicarbazona, muzolimina, pargilina, pempidina, pinacidil, piperoxano, primaperona, protoveratrina, raubasina, rescimetol, rilmenideno, saralasina, nitroprusiato de sodio, ticrinafeno, camsilato de trimetafano, tirosinasa y urapidil.

En determinadas realizaciones, un antihipertensor puede comprender un derivado de ariletanolamina, un derivado de benzotiadiazina, un derivado de 7V-carboxialquil(péptido/lactama), un derivado de dihidropiridina, un derivado de guanidina, hidracina/ftalazina, un derivado de imidazol, un compuesto de amonio cuaternario, un derivado de reserpina o un derivado de sulfonamida. Los ejemplos no limitativos de derivados de ariletanolamina incluyen amosulalol, bufuralol, dilevalol, labetalol, pronetalol, sotalol y sulfinalol. Los ejemplos no limitativos de derivados de benzotiadiazina incluyen altizida, bendroflumetiazida, benztiiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, ciclotazida, diazóxido, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetizida, meticlotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclormetiazida y triclorometiazida. Los ejemplos no limitativos de derivados de N-carboxialquil(péptido/lactama) incluyen alacepril, captopril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilato, fosinopril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril y ramipril. Los ejemplos no limitativos de derivados de dihidropiridina incluyen amlodipino, felodipino, isradipino, nifedipino, nifedipino, nilvadipino, nisoldipino y nitrendipino. Los ejemplos no limitativos de derivados de guanidina incluyen betanidina, debrisoquina, guanabenz, guanacina, guanadrel, guanazodina, guanetidina, guanfacina, guanoclor, guanoxabenz y guanoxan. Los ejemplos no limitativos de hidrazinas/ftalazinas incluyen budralazina, cadralazina, dihidralazina, endralazina, hidracarbazina, hidralazina, feniprazina, pildralazina y todralazina. Los ejemplos no limitativos de derivados de imidazol incluyen clonidina, lofexidina, fentolamina, tiamenidina y tolonidina. Los ejemplos no limitativos de compuestos de amonio cuaternario incluyen bromuro de azametonio, cloruro de clorisondamina, hexametonio, bis(metilsulfato) de pentacinio, bromuro de pentametonio, tartrato de pentolinio, cloruro de fenactropinio y metosulfato de trimetidinio. Los ejemplos no limitativos de derivados de reserpina incluyen bietaserpina, deserpidina, rescinamina, reserpina y sirotingopina. Los ejemplos no limitativos de derivados de sulfonamida incluyen ambusida, clopamida, furosemida, indapamida, quinetazona, tripamida y xipamida. Generalmente se usan vasopresores para aumentar la tensión arterial durante un choque, lo que puede producirse durante un procedimiento quirúrgico. Los ejemplos no limitativos de un vasopresor, también conocido como un antihipotensor, incluyen metilsulfato de amezinio, amida de angiotensina, dimetofrina, dopamina, etifelmina, etilefrina, gepefrina, metaraminol, midodrina, norepinefrina, foledrina y sinefrina. Los ejemplos no limitativos de agentes para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen agentes anti-angiotensina II, tratamiento de reducción de poscarga-precarga, agentes diuréticos e ionotrópicos.

En determinadas realizaciones, un paciente animal, por ejemplo un ser humano, que no puede tolerar un antagonista de angiotensina puede tratarse con una terapia de combinación. Tal terapia puede combinar la administración de hidralazina (Apresoline) y dinitrato de isosorbida (Isordil, Sorbitrate).

Los ejemplos no limitativos de diuréticos incluyen un derivado de tiazida o benzotiadiazina (por ejemplo, altiazida, bendroflumetazida, benztiiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclorometiazida, triclorometiazida), un organomercurial (por ejemplo, clormerodrino, meralurida, mercamfamida, mercaptomerina sódica, ácido mercumalílico, mercumatilina sódica, cloruro de mercurio, mersalilo), una pteridina (por ejemplo, furtereno, triamtereno), purinas (por ejemplo, acefillina, 7-morfoilinoetilteofilina, pamobrom, proteobromina, teobromina), esteroides incluyendo antagonistas de aldosterona (por ejemplo, canrenona, oleandrina, espirolactona), un derivado de sulfonamida (por ejemplo, acetazolamida, ambusida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloramino fenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, difenilmetano-4,4'-disulfonamida, disulfamida, etoxzolamida, furosemida, indapamida, mefrusida, metazolamida, piretanida, quinetazona, torasemida, tripamida, xipamida), un uracilo (por ejemplo, aminometradina, amisometradina), un antagonista ahorrador de potasio (por ejemplo, amilorida, triamtereno) o un diurético diverso tal como aminozina, arbutina, clorazano, ácido etacrínico, etozolina, hidracarbazina, isosorbida, manitol, metochalcona, muzolimina, perhexilina, ticrinafeno y urea.

Los ejemplos no limitativos de agentes ionotrópicos positivos, también conocidos como cardiotónicos, incluyen acefillina, una acetildigitoxina, 2-amino 4-picolina, amrinona, hemisuccinato de benfurodilo, bucladesina, cerberosina, camfotamida, convalatoxina, cimarina, denopamina, deslanósido, digitalina, digitalis, digitoxina, digoxina, dobutamina, dopamina, dopexamina, enoximona, eritrofleína, fenalcomina, gitalina, gitoxina, glicociamina, heptaminol, hidrastinina, ibopamina, un lantósido, metamivam, milrinona, nerifolina, oleandrina, ouabaína, oxifedrina, prenalterol, proscillaridina, resibufogenina, escilareno, escilarenina, estrofantina, sulmazol, teobromina y xamoterol.

En realizaciones particulares, un agente ionotrópico es un glucósido cardíaco, agonista beta-adrenérgico o un inhibidor de fosfodiesterasa. Los ejemplos no limitativos de glucósidos cardíacos incluyen digoxina (lanoxina) y digitoxina (crisodigina). Los ejemplos no limitativos de agonistas beta-adrenérgicos incluyen albuterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clenbuterol, clorprenalina, denopamina, dioxetedrina, dobutamina (Dobutrex), dopamina

(Intropin), dopexamina, efedrina, etafedrina, epinorepinefrina, fenoterol, formoterol, hexoprenalina, ibopamina, isoetarina, isoproterenol, mabuterol, metaproterenol, metoxifenamina, oxifedrina, pirbuterol, procaterol, protoquilol, reproterol, rimiterol, ritodrina, soterenol, terbutalina, tretoquinol, tulobuterol y xamoterol. Los ejemplos no limitativos de un inhibidor de fosfodiesterasa incluyen amrinona (Inocor).

Los agentes antianginosos pueden comprender organonitratos, bloqueantes de los canales de calcio, beta-bloqueantes y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de organonitratos, también conocidos como nitrovasodilatadores, incluyen nitroglicerina (nitro-bid, nitrostat), dinitrato de isosorbida (Isordil, sorbitrato) y nitrato de amilo (Aspirol, Vaporole). La endotelina (ET) es un péptido de 21 aminoácidos que tiene efectos fisiológicos y patofisiológicos potentes que parecen estar implicados en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Los efectos de la ET están mediados a través de la interacción con dos clases de receptores de la superficie celular. El receptor de tipo A (ET-A) está asociado con vasoconstricción y crecimiento celular, mientras que el receptor de tipo B (ET-B) está asociado con vasodilatación mediada por células endoteliales y con la liberación de otras neurohormonas, tales como aldosterona. Se conocen en la técnica agentes farmacológicos que pueden inhibir o bien la producción de ET o bien su capacidad para estimular células relevantes. La inhibición de la producción de ET implica el uso de agentes que bloquean una enzima denominada enzima convertidora de endotelina que está implicada en el procesamiento del péptido activo a partir de su precursor. La inhibición de la capacidad de ET para estimular células implica el uso de agentes que bloquean la interacción de ET con sus receptores. Los ejemplos no limitativos de antagonistas del receptor de endotelina (ERA) incluyen bosentano, enrasentán, ambrisentán, darusentán, tezosentán, atrasentán, avosentán, clazosentán, edonentán, sitaxsentán, TBC 3711, BQ 123 y BQ 788.

Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que el análisis de los nucleótidos presentes según el método de la invención en el ácido nucleico de un individuo puede realizarse mediante cualquier método o técnica capaz de determinar los nucleótidos presentes en un sitio polimórfico. Tal como es obvio en la técnica, los nucleótidos presentes en los marcadores polimórficos pueden determinarse o bien partir de cualquier cadena de ácido nucleico o bien a partir de ambas cadenas.

Una vez que se ha obtenido una muestra biológica de un sujeto (por ejemplo, un fluido corporal, tal como orina, saliva, plasma, suero o una muestra tisular, tal como una muestra de tejido bucal o una célula bucal) normalmente se lleva a cabo la detección de una variación de secuencia o SNP de variante alélica. Puede emplearse prácticamente cualquier método conocido por el experto en la técnica. Quizá el método más directo es determinar realmente la secuencia o bien del ADN genómico o bien del ADNc y comparar estas secuencias con los SNP de alelos conocidos del gen. Este puede ser un procedimiento bastante caro y que lleva mucho tiempo. No obstante, esta tecnología es bastante común y se conoce bien.

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

Existen otros métodos disponibles comercialmente para la identificación de SNP de alto rendimiento sin usar tecnologías de secuenciación directa. Por ejemplo, Veracode Technology de Illumina, química de genotipado de SNP Taqman® y química de genotipado de SNP KASPar.

Una variación del método de determinación de secuencias directo es el método Gene Chip™ disponible de Affymetrix. Alternativamente, también están disponibles comercialmente modos rigurosos y menos caros de determinar la variación de secuencia de ADN. Por ejemplo, Perkin Elmer adaptó su TAQman Assay™ para detectar variación de secuencia. Orchid BioSciences tiene un método denominado SNP-IT™ (Tecnología de identificación de SNP) que usa extensión con cebador con análogos de nucleótidos marcados para determinar qué nucleótido se produce en la posición inmediatamente en 3' con respecto a una sonda de oligonucleótido, entonces se identifica la base extendida usando fluorescencia directa, un ensayo colorimétrico indirecto, espectrometría de masas o polarización de fluorescencia. Sequenom usa una tecnología de captura de hibridación más MALDI-TOF (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz – espectrometría de masas de tiempo de vuelo) para detectar genotipos de SNP con su sistema MassARRAY™. Promega proporciona el READIT™ SNP/Genotyping System (patente estadounidense n.º 6.159.693). En este método, se hibridan sondas de ADN o ARN con secuencias diana de ácido nucleico. Las sondas que son complementarias a la secuencia diana en cada base se despolimerizan con una mezcla de enzimas patentada, mientras que las sondas que difieren de la diana en la posición de consulta permanecen intactas. El método usa química de pirofosforilación en combinación con detección de luciferasa para proporcionar un sistema de puntuación de SNP altamente sensible y adaptable. Third Wave Technologies tiene el método Invader OS™ que usa enzimas Cleavaseg patentadas, que reconocen y cortan sólo la estructura específica formada durante el procedimiento Invader. Invader OS se basa en la amplificación lineal de la señal generada por el procedimiento Invader, más que en la amplificación exponencial de la diana. El ensayo Invader OS no utiliza PCR en ninguna parte del ensayo. Además, hay varios laboratorios de análisis forenses de ADN y muchos laboratorios de investigación que usan PCR específica de gen, seguida por digestión con endonucleasa de restricción y electroforesis en gel (u otra tecnología de separación por tamaño) para detectar polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP).

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la presencia o ausencia de los SNP se identifica mediante la amplificación o no amplificación de un producto de amplificación a partir de la muestra. Las amplificaciones de polinucleótidos normalmente son dependientes del molde. Tales amplificaciones se basan generalmente en la existencia de una cadena de molde para obtener copias adicionales del molde. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos que son capaces de cebar la síntesis del ácido nucleico en formación en un procedimiento dependiente de molde, que se hibrida con la cadena de molde. Normalmente, los cebadores tienen de diez a treinta pares de bases de longitud, pero pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque generalmente se prefiere la forma monocatenaria. Con frecuencia, los pares de cebadores se diseñan para hibridarse selectivamente con regiones distintas de un ácido nucleico de molde, y se ponen en contacto con el ADN de molde en condiciones que permiten la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, pueden seleccionarse condiciones de hibridación de alta rigurosidad que sólo permitirán la hibridación con secuencias que son completamente complementarias con los cebadores. En otras realizaciones, la hibridación puede producirse en rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más apareamientos erróneos con las secuencias de cebador. Una vez hibridado, el complejo molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también denominadas "ciclos," hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se dispone de varios procedimientos dependientes de molde para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa. En la PCR, se usan pares de cebadores que se hibridan selectivamente con ácidos nucleicos en condiciones que permiten la hibridación selectiva. El término "cebador", tal como se usa en el presente documento, engloba cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico en formación en un procedimiento dependiente de molde. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria o monocatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Los cebadores se usan en cualquiera de varios procedimientos dependientes de molde para amplificar las secuencias génicas diana presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la PCR, que se describe en detalle en las patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159. En la PCR, se preparan dos secuencias de cebador que son complementarias con regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia del/de los gen(es) diana. Los cebadores se hibridarán para formar un complejo ácido nucleico:cebador si la secuencia del/de los gen(es) diana está presente en una muestra. Se añade un exceso de desoxirribonucleósido trifosfatos a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, por ejemplo Taq polimerasa, que facilita la síntesis del ácido nucleico dependiente de molde. Si se ha formado el complejo secuencia del/de los gen(es) diana:cebador, la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia del/de los gen(es) diana añadiendo nucleótidos. Mediante la elevación y disminución de la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del/de los gen(es) diana para formar los productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al/a los gen(es) diana y a los productos de reacción y se repite el procedimiento. Estas múltiples rondas de amplificación, denominadas "ciclos", se realizan hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

El producto de amplificación puede digerirse con una enzima de restricción antes del análisis. Todavía en otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la presencia o ausencia del SNP se identifica hibridando la muestra de ácido nucleico con un cebador marcado con un resto detectable. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el resto detectable se detecta en un ensayo enzimático, radioensayo, inmunoensayo o mediante detección de fluorescencia. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el cebador se marca con un colorante detectable (por ejemplo, SYBR Green 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 ubican en un chip. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, los cebadores para amplificación son específicos para dichos SNP.

Otro método para la amplificación es 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 a través de la polimerización de nucleótidos. En la LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias, y en presencia de una secuencia diana, cada par se unirá a cadenas complementarias opuestas de la diana de manera que estén en contacto. En presencia de una ligasa, los dos pares de sonda se unirán para formar una única unidad. Mediante ciclos de temperatura, como en la PCR, las unidades ligadas vinculadas se disocian de la diana y entonces sirven como "secuencias diana" para la ligación de pares de sondas en exceso. La patente estadounidense n.º 4.883.750 describe un método similar a la LCR para unir pares de sondas a una secuencia diana.

Amplificación isotérmica

Un método de amplificación isotérmica, en el que se usan endonucleasas de restricción y ligasas para lograr la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[[alfa]-tio]-trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención. En una

realización, se usa el método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la tipificación de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

Amplificación por desplazamiento de cadena

5 La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) es otro método de llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples rondas de desplazamiento y síntesis de cadenas, es decir, desplazamiento de mella. Un método similar, denominado reacción en cadena de reparación (RCR), implica hibridar varias sondas por toda una región seleccionada como diana para la amplificación, seguido por una reacción de reparación en la que sólo están presentes dos de las cuatro bases. Las otras dos bases pueden añadirse como derivados biotinilados para una fácil detección.

Amplificación basada en la transcripción

15 Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basada en la transcripción, incluyendo amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos. En la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos, los ácidos nucleicos se preparan para la amplificación mediante extracción convencional con fenol/cloroformo, desnaturalización con calor de una muestra clínica, tratamiento con tampón de lisis y columnas MiniSpin para aislamiento de ADN y ARN o extracción de ARN con cloruro de guanidinio. Estas técnicas de amplificación implican hibridar un cebador, que tiene secuencias específicas diana. Tras la polimerización, se digieren híbridos de ADN/ARN con ARNasa H mientras que las moléculas de ADN bicatenario se desnaturalizan con calor de nuevo. En cualquier caso, el ADN monocatenario se convierte completamente en bicatenario mediante la adición del segundo cebador específico de diana, seguido por polimerización. Las moléculas de ADN bicatenario se transcriben entonces múltiples veces mediante una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN se someten a transcripción inversa dando ADN bicatenario, y se transcriben una vez más con una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, ya estén truncados o completos, indican secuencias diana específicas.

30 Pueden usarse otros métodos de amplificación según la presente invención. En una realización, se usan cebadores "modificados" en una síntesis dependiente de molde y enzimas similar a la PCR. Los cebadores pueden modificarse mediante marcaje con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto detector (por ejemplo, una enzima). En presencia de una secuencia diana, la sonda se une y se escinde catalíticamente. Tras la escisión, la secuencia diana se libera intacta para unirse mediante la sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana. En otro enfoque, un procedimiento de amplificación de ácido nucleico implica sintetizar de manera cíclica ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc) que pueden usarse según la presente invención. El ARNmc es un primer molde para un primer oligonucleótido de cebador, que se extiende mediante transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). Entonces se retira el ARN del dúplex ADN:ARN resultante mediante la acción de la ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica para ARN en dúplex o bien con ADN o bien con ARN). El ADNmc resultante es un segundo molde para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (ejemplificado mediante ARN polimerasa de T7) en 5' por su homología con el molde. Este cebador se extiende entonces mediante ADN polimerasa (ejemplificada mediante el fragmento "Klenow" grande de una ADN polimerasa I de *E. coli*), que da 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 de promotor. Esta secuencia de promotor puede usarse por la ARN polimerasa apropiada para obtener muchas copias de ARN del ADN. Estas copias pueden volver a entrar entonces en el ciclo lo que conduce a una amplificación muy rápida. Con la elección apropiada de enzimas, esta amplificación puede realizarse de manera isotérmica sin la adición de enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este procedimiento, puede elegirse que la secuencia de partida esté en forma o bien de ADN o bien de ARN.

Métodos para la separación del ácido nucleico

55 Puede ser deseable separar productos de ácido nucleico de otros materiales, tales como el molde y el cebador en exceso. En una realización, los productos de amplificación se separaran mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poli(acrilamida) usando métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989, véase a continuación). Los productos de amplificación separados pueden cortarse y eluirse del gel para su manipulación adicional. Usando geles de agarosa de bajo punto de fusión, puede retirarse la banda separada calentando el gel, seguido por extracción del ácido nucleico. La separación de ácidos nucleicos también puede verse afectada por técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Hay muchos tipos de cromatografía que pueden usarse en la práctica de la presente invención, incluyendo cromatografía de adsorción, partición, intercambio iónico, hidroxiapatita, tamiz molecular, fase inversa, columna, papel, capa fina y gases así como HPLC. En determinadas realizaciones, se visualizan los productos de amplificación. Un método de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de bandas bajo luz UV. Alternativamente, si los productos de amplificación se marcan de manera integral con nucleótidos radiomarcados o marcados fluorométricamente, Los productos de amplificación separados pueden exponerse a una película de rayos X o visualizarse con luz que muestra los espectros de excitación apropiados.

Alternativamente, la presencia de las posiciones polimórficas según los métodos de la invención puede determinarse mediante hibridación o falta de hibridación con una sonda de ácido nucleico adecuada específica para un ácido nucleico polimórfico pero no con el ácido nucleico mutado. Mediante "hibridar" quiere decirse un par que forma una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias, o partes de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa normalmente será de NaCl de menos de aproximadamente 750 mM y citrato de trisodio de menos de aproximadamente 75 mM, preferiblemente NaCl de menos de aproximadamente 500 mM y citrato de trisodio de menos de aproximadamente 50 mM, y más preferiblemente NaCl de menos de aproximadamente 250 mM y citrato de sodio de menos de aproximadamente 25 mM. Puede obtenerse hibridación de baja rigurosidad en ausencia de un disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse hibridación de alta rigurosidad en presencia de formamida a al menos aproximadamente el 35%, y más preferiblemente formamida a al menos aproximadamente el 50%. Las condiciones de temperatura rigurosas normalmente incluirán 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. Los expertos en la técnica conocen bien diversos parámetros adicionales, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN portador. Se logran diversos niveles de rigurosidad combinando estas condiciones diversas según sea necesario. En una realización preferida, la hibridación se producirá a 30°C en NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM y SDS al 1%. En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 37°C en NaCl 500 mM, citrato de trisodio 50 mM, SDS al 1%, formamida al 35% y ADN de esperma de salmón (ADNss) desnaturalizado 100 [µg/ml]. En la realización más preferida, la hibridación se producirá a 42°C en NaCl 250 mM, citrato de trisodio 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50% y ADNss 200 [µg/ml]. Variaciones útiles en estas condiciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Para la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden definirse mediante la concentración de sal y mediante la temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad de lavado puede aumentarse disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente de NaCl de menos de aproximadamente 30 mM y citrato de trisodio de menos de aproximadamente 3 mM, y lo más preferiblemente NaCl de menos de aproximadamente 15 mM y citrato de trisodio de menos de aproximadamente 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado normalmente incluirán una temperatura de al menos aproximadamente 25°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68°C. En una realización preferida, las etapas de lavado se producirán a 25°C en NaCl 30 mM, citrato de trisodio 3 mM y SDS al 0,1%. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 42°C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1%. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 68°C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1%. Variaciones adicionales en estas condiciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de hibridación 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.* (*Actual Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger y Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, New York); y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Las moléculas de ácido nucleico útiles para la hibridación en los métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que muestre identidad sustancial como para poder hibridarse específicamente con los ácidos nucleicos diana. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con una secuencia endógena normalmente son capaces de hibridarse con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Por "sustancialmente idéntica" se quiere decir una molécula de polipéptido o ácido nucleico que muestra una identidad de al menos el 50% con respecto a una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico de referencia. Preferiblemente, una secuencia de este tipo es idéntica en al menos el 60%, más preferiblemente el 80% o el 85%, y más preferiblemente el 90%, el 95% o incluso el 99% a nivel de aminoácido o de ácido nucleico a la secuencia usada para la comparación. La identidad de secuencia normalmente se mide usando software de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/ PRETTYBOX). Un software de este tipo empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas normalmente incluyen 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 a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad de entre e^{-3} y e^{-100} lo que indica una secuencia estrechamente relacionada.

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 dispositivo de exploración para determinar los niveles y patrones de fluorescencia.

Método para reclasificar a los pacientes a un estado de riesgo más apropiado.

Otro objeto de la presente divulgación es la mejora de las escalas/métodos/funciones de riesgo cardiovascular en uso hoy en día introduciendo en la función el riesgo conferido por la combinación particular de marcadores de SNP tal como se expone en la tabla 1 asociados con un riesgo de enfermedad/trastorno cardiovascular y/o con un riesgo de complicaciones de enfermedad o acontecimiento cardiovascular incluyendo, pero sin limitarse a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma aórtico y muerte. Los factores de riesgo cardiovascular en uso hoy en día incluyen, pero no se limitan a, la función de Framingham original, la función de Framingham adaptada (tal como pero sin limitarse a la función de REGICOR), función de PROCAM, función de SCORE y función de QRISK. La mejora de las funciones de Framingham, PROCAM, REGICOR y QRISK se muestra como las funciones 1a y 1b.

Función 1a (véase también la reivindicación 5)

Esta ecuación general puede usarse para calcular el riesgo coronario o cardiovascular usando los factores de riesgo y efectos de los factores de riesgo incluidos y definidos en las funciones de FRAMINGHAM (la original y/o la adaptada tal como pero sin limitarse a REGICOR), PROCAM y QRISK:

en la que,

$$\text{prob}(\text{acontecimiento}_i | \text{CRF}_{p,i}, \text{SNP}_{j,i}) = 1 - \hat{S}^{\exp \left[\sum_{p=1}^P \beta_{\text{CRF}_p} * \text{CRF}_{p,i} + \sum_{j=1}^J \beta_{\text{SNP}_j} * \text{SNP}_{j,i} - \sum_{p=1}^P \beta_{\text{CRF}_p} * \overline{\text{CRF}_p} - \sum_{j=1}^J \beta_{\text{SNP}_j} * \overline{\text{SNP}_j} \right]}$$

• prob(acontecimiento | CRF,SNP): probabilidad de presentar un acontecimiento coronario dada una combinación de factores de riesgo coronario (CRF) y características genéticas (SNP).

a. acontecimiento: acontecimiento coronario (infarto de miocardio o angina de pecho mortal y no mortal) en un periodo de 10 años para un individuo “i”.

b. CRF_{p,i}: valor de cada factor de riesgo coronario “p” incluido en la ecuación para un individuo “i”. La lista de factores de riesgo coronario incluidos en el modelo se muestra en la tabla A.

c. SNP_{j,i}: número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para una variante genética específica “j” incluidos en la ecuación para un individuo “i”. Las variantes actualmente incluidas en el modelo se muestran en la tabla B.

• \hat{S} : supervivencia media libre de acontecimientos coronarios en la población. Esta supervivencia se adaptará a las tasas regionales o nacionales.

• exp: exponenciación natural.

• $\sum_{p=1}^P \beta_{\text{CRF}_p} * \text{CRF}_{p,i}$ donde

a. $\sum_{p=1}^P$ función sumatoria a lo largo de los P factores de riesgo clásicos.

b. β_{CRF_p} logaritmo de la razón de riesgo que corresponde al factor de riesgo coronario clásico “p”. Los valores de β para cada factor de riesgo coronario “p” se muestran en la tabla A.

c. CRF_{p,i}: valor de cada factor de riesgo coronario “p” incluido en la ecuación para un individuo “i”.

• $\sum_{j=1}^J \beta_{\text{SNP}_j} * \text{SNP}_{j,i}$ donde

a. $\sum_{j=1}^J$ función sumatoria a lo largo de las J variantes genéticas.

b. β_{SNP_j} logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la variante genética “j”. El posible intervalo de

valores de β para cada variante genética “j” se muestra en la tabla B.

c. $SNP_{j,i}$: número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para una variante genética específica “j” incluidos en la ecuación para un individuo “i”.

5 • \overline{CRF}_p : valor promedio para el factor de riesgo clásico “p” en la población. Este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional.

• \overline{SNP}_j : número de copias de alelo de riesgo promedio para la variante genética “j” en la población.

10 Este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional.

Tabla A. Lista de factores de riesgo coronario incluidos en el presente modelo inventivo, logaritmo de la razón de riesgo, β_{CRF_p} , para cada factor de riesgo clásico por sexo, intervalo de los valores promedio para el factor de riesgo

15 clásico “p” en la población, y tasa de supervivencia media libre de acontecimientos coronarios en la población (\hat{S}) (intervalo de posibles valores).

	CRF _p	β_{CRF_p} para hombres	β_{CRF_p} para mujeres	\overline{CRF}_p
FRAMINGHAM (original o adaptación)	Edad	0,048	0,338	35-74
	Edad ²	0	-0,003	
	Colesterol total (mg/dl)			
	<160	-0,659	-0,261	0-30
	160 - <200	0	0	0-30
	200 - <240	0,177	0,208	0-30
	240 - <280	0,505	0,244	0-30
	≥280	0,657	0,53	0-30
	Colesterol-HDL (mg/dl)			
	<35	0,497	0,843	0-30
	35 - <45	0,243	0,378	0-30
	45 - <50	0	0,198	0-30
	50 - <60	-0,051	0	0-30
	≥60	-0,487	-0,430	0-30
	Tensión arterial			
	Óptima	-0,002	-0,534	0-30
Normal	0	0	0-30	
Límite alto	0,283	-0,068	0-30	
Hipertensión I	0,522	0,263	0-30	
Hipertensión II	0,619	0,466	0-30	
Diabetes	0,428	0,597	0-30	
Tabaquismo	0,523	0,292	0-60	
PROCAM	Edad	0,103	-	35-74
	Colesterol-LDL (mg/dl)	0,013	-	100-250
	Colesterol-HDL (mg/dl)	-0,032	-	35-65
	Triglicéridos (mg/dl)	0,317	-	100-200
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,010	-	100-160
	Antecedentes familiares de MI	0,382	-	1-45
Diabetes	0,399	-	0-30	
QRISK	Log(edad/10)	4,474	3,925	35-74
	Colesterol total/Col.-HDL	0,001	0,001	2-10
	Índice de masa corporal (kg/m ²)	0,015	0,022	22-32
	Antecedentes familiares de CVD	0,206	0,262	1-45

	prematura			
	Tabaquismo	0,425	0,349	0-60
	Puntuación de Townsend de área de salida	0,034	0,017	-3-3
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,005	0,004	100-160
	Tratamiento para la hipertensión	0,550	0,614	0-40
	Interacción con tratamiento de SBP*HTN	-0,004	-0,007	---
	Supervivencia media \hat{S}	0,951 (0,01-9,00)	0,978 (0,01-9,00)	

Tabla B. Variantes actualmente incluidas en el presente modelo inventivo, logaritmo de la razón de riesgo (intervalo de posibles valores), β_{SNP_j} y número de copias de alelo de riesgo promedio (intervalo de posibles valores), \overline{SNP}_j , para cada variante genética.

5

SNP _j	β_{SNP_j}	\overline{SNP}_j
rs17465637	0,1310 (0,0100 - 0,5000)	1,48 (0,3-2,8)
Rs67258887	0,1310 (0,0100 - 0,5000)	0,3 (0,15-1,4)
Rs9818870	0,1133 (0,0100 - 0,5000)	0,36 (0,15-1,4)
Rs12526453	0,0953 (0,0100 - 0,5000)	1,34 (0,3-2,8)
Rs1333049	0,2546 (0-0100 - 1,0000)	0,92 (0,3-2,8)
Rs1746048	0,0862 (0,0100 - 0,5000)	1,74 (0,3-2,8)
Rs9982601	0,1655 (0,0100 - 0,5000)	0,3 (0,15-1,4)
Rs10455872	0,2852 (0,0100 - 1,0000)	0,14 (0,1-1,4)
Rs17216473*	0,1310 (0,0100 - 0,5000)	0,08 (0,05-0,5)
Rs10507391*	0,1310 (0,0100 - 0,5000)	0,08 (0,05-0,5)
Rs9315051	0,0000 (0,0100 - 0,5000)	1 (0,3-2,8)
Rs17222842*	0,1310 (0,0100 - 0,5000)	0,08 (0,05-0,5)
Rs6922269	0,0000 (0,0100 - 0,5000)	1 (0,3-2,8)
Rs17228212	0,1906 (0,0100 - 0,5000)	0,6 (0,3-2,8)
R4769874	0,0000 (0,0100 - 0,5000)	1 (0,3-2,8)
Rs9315050*	0,1310 (0,0100 - 0,5000)	0,08 (0,05-0,5)
Rs9551963	0,0000 (0,0100 - 0,5000)	1 (0,3-2,8)
Rs17222814	0,0000 (0,0100 - 0,5000)	1 (0,3-2,8)
Rs3798220	0,4121 (0,0100 - 1,0000)	0,04 (0,05-0,5)
CD005	1,5000 (0,0100 - 3,0000)	0,004 (0,001-0,01)
Rs17114036	0,1570 (0,0100 - 0,5000)	1,82 (0,3-2,8)
Rs17609940	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	1,5 (0,3-2,8)
Rs12190287	0,0770 (0,0100 - 0,5000)	1,24 (0,3-2,8)
Rs11556924	0,0862 (0,0100 - 0,5000)	1,24 (0,3-2,8)
Rs4773144	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	0,88 (0,3-2,8)
Rs2895811	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	0,86 (0,3-2,8)
Rs3825807	0,0770 (0,0100 - 0,5000)	1,14 (0,3-2,8)
Rs216172	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	0,74 (0,3-2,8)
Rs12936587	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	1,12 (0,3-2,8)
Rs46522	0,0583 (0,0100 - 0,5000)	1,06 (0,3-2,8)
Rs974819	0,067 (0,0100 - 0,5000)	0,06 (0,01-0,5)
Rs4380028	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	1,2 (0,3-2,8)
Rs10953541	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	1,5 (0,3-2,8)
Rs2505083	0,0677 (0,0100 - 0,5000)	0,84 (0,3-2,8)

* Todos estos SNP definen el haplotipo B de ALOX5AP que tiene un tamaño de efecto definido mediante el valor de β 0,1310.

Función 1b (véase también la reivindicación 6)

10 Esta ecuación general puede usarse para calcular el riesgo coronario o cardiovascular usando los factores de riesgo y efectos de los factores de riesgo incluidos y definidos en las funciones de Framingham (la original y/o la adaptada tal como pero sin limitarse a REGICOR), PROCAM y QRISK:

$$\text{prob}(\text{acontecimiento}_i | \text{CRF}_{p,i}, \text{GRS}_i) = 1 - \hat{S} \exp \left[\sum_{p=1}^P \beta_{\text{CRF}_p} * \text{CRF}_{p,i} + \beta_{\text{GRS}} * \text{GRS}_i - \sum_{p=1}^P \beta_{\text{CRF}_p} * \overline{\text{CRF}_p} - \beta_{\text{GRS}} * \overline{\text{GRS}} \right]$$

en la que

- 5 • $\text{prob}(\text{acontecimiento}_i | \text{CRF}_{p,i}, \text{GRS}_i)$: probabilidad de presentar un acontecimiento coronario dada una combinación de factores de riesgo coronario (CRF) y puntuación de riesgo genético (GRS).
- 10 a. acontecimiento_i : acontecimiento coronario (infarto de miocardio o angina de pecho mortal y no mortal) en un periodo de 10 años para un individuo "i".
- 15 b. $\text{CRF}_{p,i}$: valor de cada factor de riesgo coronario "p" incluido en la ecuación para un individuo "i". La lista de factores de riesgo coronario incluidos en el modelo se muestra en la tabla C.
- 20 c. GRS_i : puntuación de riesgo genético definida como el número ponderado de alelos de riesgo (0, 1, 2) para las variantes genéticas incluidas en la ecuación para un individuo "i". Las variantes actualmente incluidas en la puntuación de riesgo genético se muestran en la tabla B. Las ponderaciones son proporcionales a las betas de cada SNP incluido en la puntuación (mostradas en la tabla B), y el intervalo de la GRS va desde 0 hasta dos veces el número de SNP incluidos en la puntuación.
- \hat{S} : supervivencia media libre de acontecimientos coronarios en la población. Esta supervivencia se adaptará a las tasas regionales o nacionales.
- \exp : exponenciación natural.
- 25 • $\sum_{p=1}^P \beta_{\text{CRF}_p} * \text{CRF}_{p,i}$: donde
 - a. $\sum_{p=1}^P$ función sumatoria a lo largo de los P factores de riesgo clásicos.
 - 30 b. β_{CRF_p} logaritmo de la razón de riesgo que corresponde al factor de riesgo coronario clásico "p". Los valores de β para cada factor de riesgo coronario "p" se muestran en la tabla C.
 - c. $\text{CRF}_{p,i}$: valor de cada factor de riesgo coronario "p" incluido en la ecuación para un individuo "i".
 - 35 • β_{GRS} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a un aumento de una unidad en el valor de la puntuación de riesgo genético. El valor de este β_{GRS} es de 0,104 con un intervalo de valores que van desde 0,010 hasta 0,500.
 - $\overline{\text{CRF}_p}$: valor promedio para el factor de riesgo clásico "p" en la población. Este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional.
 - 40 • $\overline{\text{GRS}}$: valor medio de la puntuación de riesgo genético en la población.

45 Tabla C. Lista de factores de riesgo coronario incluidos en el presente modelo inventivo, logaritmo de la razón de riesgo, β_{CRF_p} , para cada factor de riesgo clásico por sexo, intervalo de los valores promedio para el factor de riesgo clásico "p" en la población, y tasa de supervivencia media libre de acontecimientos coronarios en la población (\hat{S}) (intervalo de posibles valores).

	CRF _p	β_{CRF_p} para hombres	β_{CRF_p} para mujeres	$\overline{\text{CRF}_p}$
FRAMINGHAM (original o adaptación)	Edad	0,048	0,338	35-74
	Edad ²	0	-0,003	
	Colesterol total (mg/dl)			

ES 2 573 648 T3

	<160	-0,659	-0,261	0-30
	160 - <200	0	0	0-30
	200 - <240	0,177	0,208	0-30
	240 - <280	0,505	0,244	0-30
	≥280	0,657	0,53	0-30
	Colesterol HDL (mg/dl)			
	<35	0,497	0,843	0-30
	35 - <45	0,243	0,378	0-30
	45 - <50	0	0,198	0-30
	50 - <60	-0,051	0	0-30
	≥60	-0,487	-0,430	0-30
	Tensión arterial			
	Óptima	-0,002	-0,534	0-30
	Normal	0	0	0-30
	Límite alto	0,283	-0,068	0-30
	Hipertensión I	0,522	0,263	0-30
	Hipertensión II	0,619	0,466	0-30
	Diabetes	0,428	0,597	0-30
	Tabaquismo	0,523	0,292	0-60
PROCAM	Edad	0,103	-	35-74
	Colesterol-LDL (mg/dl)	0,013	-	100-250
	Colesterol-HDL (mg/dl)	-0,032	-	35-65
	Triglicéridos (mg/dl)	0,317	-	100-200
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,010	-	100-160
	Antecedentes familiares de MI	0,382	-	1-45
	Diabetes	0,399	-	0-30
QRISK	Log(edad/10)	4,474	3,925	35-74
	Colesterol total/Col.-HDL	0,001	0,001	2-10
	Índice de masa corporal (kg/m ²)	0,015	0,022	22-32
	Antecedentes familiares de CVD prematura	0,206	0,262	1-45
	Tabaquismo	0,425	0,349	0-60
	Puntuación de Townsend de área de salida	0,034	0,017	-3-3
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,005	0,004	100-160
	Tratamiento para la hipertensión	0,550	0,614	0-40
	Interacción con tratamiento de SBP*HTN	-0,004	-0,007	---
	Supervivencia media \hat{S}	0,951 (0,01-9,00)	0,978 (0,01-9,00)	

Función 1c (véase también la reivindicación 7)

El riesgo cardiovascular se calculará usando las siguientes ecuaciones usando la función de riesgo de SCORE:

5

Primera etapa: calcular la combinación lineal de factores de riesgo

$$w_i = \beta_{col} * (colesterol_i - 6) + \beta_{SPB} * (SBP_i - 120) + \beta_{fumador} * actual_i + \sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * (SNP_{i,j} - \overline{SNP}_{i,j})$$

donde

- $colesteroli$: nivel de colesterol para el individuo "i" en mmol/l.
- 5 • β_{col} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde al colesterol (tabla E).
- SBP_i : tensión arterial sistólica para el individuo "i" en mmHg.
- 10 • β_{SBP} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la tensión arterial sistólica (tabla E).
- $actual_i$: estado de tabaquismo actual para el individuo "i" (1: actual, 0: anterior/nunca).
- $\beta_{fumador}$: logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la tensión arterial sistólica (tabla E).

$$\sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * (SNP_{i,j} - \overline{SNP}_{i,j})$$

- 15 • a. $\sum_{j=1}^J$ función sumatoria a lo largo de las J variantes genéticas.
- b. β_{SNP_j} logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la variante genética "j". El posible intervalo de valores de β para cada variante genética "j" se muestra en la tabla B.
- 20 c. $SNP_{j,i}$: número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para una variante genética específica "j" incluidos en la ecuación para un individuo "i".
- 25 d. \overline{SNP}_j : número de copias de alelo de riesgo promedio para la variante genética "j" en la población. Este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional.

Segunda etapa: calcular la supervivencia de nivel inicial.

$$30 \quad S_0(\text{edad}) = \exp\{-\exp(\alpha) * (\text{edad} - 20)^p\}$$

$$S_0(\text{edad} + 10) = \exp\{-\exp(\alpha) * (\text{edad} - 10)^p\}$$

donde

- 35 • α, p : parámetros de forma y escala de la distribución de Weibull. Sus valores se muestran en la tabla F (parámetros)
- \exp : exponenciación natural

Tercera etapa: calcular la supervivencia en 10 años

$$S(\text{edad}) = \{S_0(\text{edad})\}^{\exp(w)}$$

$$45 \quad S(\text{edad} + 10) = \{S_0(\text{edad} + 10)\}^{\exp(w)}$$

$$S_{10}(\text{edad}) = S(\text{edad} + 10) / S(\text{edad})$$

Cuarta etapa: calcular la probabilidad de padecer el acontecimiento durante el seguimiento de 10 años.

$$50 \quad \text{Riesgo}_{10}(\text{edad}) = 1 - S_{10}(\text{edad})$$

Quinta etapa: calcular la probabilidad de padecer un acontecimiento cardiovascular durante el seguimiento de 10 años como la suma del riesgo cardiovascular coronario y no coronario.

$$55 \quad \text{CVDRiesgo}_{10} = [\text{CHDRiesgo}_{10}(\text{edad})] + [\text{No-CHDRiesgo}_{10}(\text{edad})]$$

Tabla E

	CHD	CDV No CHD
Fumador actual, $\beta_{fumador}$	0,71	0,63
Colesterol (mmol/l), β_{col}	0,24	0,02
Tensión arterial sistólica (mmHg), β_{SBP}	0,018	0,022

CHD: cardiopatía coronaria
 CVD: enfermedad cardiovascular

Tabla F

País		CHD		CDV No CHD	
		A	p	A	p
Riesgo bajo	Hombres	-22,1	4,71	-26,7	5,64
	Mujeres	-29,8	6,36	-31,0	6,62
Riesgo alto	Hombres	-21,0	4,62	-25,7	5,47
	Mujeres	-28,7	6,23	-30,0	6,42

CHD: cardiopatía coronaria
 CVD: enfermedad cardiovascular

5 Función 1d

El riesgo cardiovascular se calculará usando las siguientes ecuaciones usando la función de riesgo SCORE:

Primera etapa: calcular la combinación lineal de factores de riesgo

10

$$w_i = \beta_{col} * (colesterol_i - 6) + \beta_{SBP} * (SBP_i - 120) + \beta_{fumador} * actual_i + \beta_{GRS} * (GRS_i - \overline{GRS})$$

donde

15

- $colesterol_i$: nivel de colesterol para el individuo "i" en mmol/l.

- β_{col} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde al colesterol (tabla E).

20

- SBP_i : tensión arterial sistólica para el individuo "i" en mmHg.

- β_{SBP} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la tensión arterial sistólica (tabla E).

- $actual_i$: estado de tabaquismo actual para el individuo "i" (1: actual, 0: anterior/nunca).

25

- $\beta_{fumador}$: logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la tensión arterial sistólica (tabla E).

- β_{GRS} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a un aumento de una unidad en el valor de la puntuación de riesgo genético. El valor de este β_{GRS} es de 0,104 con un intervalo de valores que van desde 0,010 hasta 0,500.

30

- GRS_i : puntuación de riesgo genético para el individuo "i" definida como el número ponderado de alelos de riesgo (0, 1, 2) para las variantes genéticas incluidas en la ecuación para un individuo "i". Las variantes actualmente incluidas en la puntuación de riesgo genético se muestran en la tabla B. Las ponderaciones son proporcionales a las betas de cada SNP incluido en la puntuación (mostradas en la tabla B), y el intervalo de la GRS va desde 0 hasta dos veces el número de SNP incluidos en la puntuación.

35

- \overline{GRS} : valor medio de la puntuación de riesgo genético en la población.

Segunda etapa: calcular la supervivencia de nivel inicial.

40

$$S_0(edad) = \exp\{-\exp(\alpha) * (edad - 20)^p\}$$

$$S_0(edad + 10) = \exp\{-\exp(\alpha) * (edad - 10)^p\}$$

45

donde

- α, p : parámetros de forma y escala de la distribución de Weibull. Sus valores se muestran en la tabla F (parámetros)

- exp: exponenciación natural

Tercera etapa: calcular la supervivencia en 10 años

5 $S(\text{edad}) = \{S_0(\text{edad})\}^{\text{exp}(w)}$

$S(\text{edad} + 10) = \{S_0(\text{edad} + 10)\}^{\text{exp}(w)}$

10 $S_{10}(\text{edad}) = S(\text{edad} + 10) / S(\text{edad})$

Cuarta etapa: calcular la probabilidad de padecer el acontecimiento durante el seguimiento de 10 años.

$Riesgo_{10}(\text{edad}) = 1 - S_{10}(\text{edad})$

15 Quinta etapa: calcular la probabilidad de padecer un acontecimiento cardiovascular durante el seguimiento de 10 años como la suma del riesgo cardiovascular coronario y no coronario.

$CVDRiesgo_{10} = [CHDRiesgo_{10}(\text{edad})] + [No-CHDRiesgo_{10}(\text{edad})]$

20 Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluidos en la presente divulgación y expuestos en la tabla 1 y aquellas combinaciones incluidas en las diferentes realizaciones y usando las funciones descritas en las funciones 1a a 1d anteriormente han demostrado ser capaces de reclasificar a los sujetos clasificados como que tienen riesgo moderado de padecer enfermedad cardiovascular y/o acontecimientos cardiovasculares y/o complicaciones cardiovasculares con una precisión mayor que la obtenida usando los factores de riesgo clásicos solos y usando las escalas/funciones en uso hoy en día o funciones publicadas incluyendo información genética.

30 Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluidos en la presente divulgación y expuestos en la tabla 1 (figura 2) y aquellas combinaciones incluida en las diferentes realizaciones y usando las funciones descritas en las funciones 1a a 1d anteriormente han demostrado ser capaces de estimar de manera precisa el riesgo de que un sujeto padezca enfermedad cardiovascular y/o acontecimientos cardiovasculares y/o complicaciones cardiovasculares con una precisión mayor que la obtenida usando los factores de riesgo clásicos solos y usando las funciones en uso hoy en día o funciones publicadas incluyendo información genética.

35 Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluidos en la presente divulgación y expuestos en la tabla 1 (figura 2) y aquellas combinaciones incluidas en las diferentes realizaciones y usando las funciones descritas en las funciones 1a a 1d anteriormente han demostrado obtener una validez mayor y una validación superior en la predicción de enfermedad cardiovascular y/o acontecimientos cardiovasculares y/o complicaciones de enfermedad cardiovascular que las obtenidas usando los factores de riesgo clásicos solos y usando las funciones en uso hoy en día o funciones publicadas incluyendo información genética. Además, también se mejoró la reclasificación.

40 Mediante el uso de las funciones descritas, se obtiene un riesgo personalizado para el desarrollo de cardiopatía coronaria y/o acontecimientos cardiovasculares y/o enfermedad cardiovascular, en particular infarto de miocardio, angina de pecho, accidente cerebrovascular, accidente isquémico transitorio, arteriopatía periférica mortales y no mortales o una combinación de los mismos. Según la función usada FRAMINGHAM (original o adaptada), estudio PROCAM, QRISK y SCORE el riesgo definirá a qué estrato de riesgo pertenecen los sujetos. El método proporcionado actualizará (reclasificará) a aquellos sujetos incorrectamente clasificados con los métodos usados hoy en día para calcular el riesgo cardiovascular a un estrato de riesgo más preciso. Como el tratamiento (preventivo y/o terapéutico) se adapta al nivel de riesgo, la reclasificación implicará el uso de manera más eficaz de las medidas preventivas y/o terapéuticas que disminuirán la incidencia y/o recurrencia de enfermedad cardiovascular y complicaciones de enfermedad cardiovascular tales como (pero sin limitarse a) infarto de miocardio, angina de pecho, accidente cerebrovascular, accidente isquémico transitorio, arteriopatía periférica mortales y no mortales o una combinación de los mismos.

Ejemplo 1

55 Se incluyó una cohorte basada en la población prospectiva; la cohorte de REGICOR (Registre Gironi del Cor) originalmente incluía 4.782 individuos de dos estudios transversales basados en la población realizados en la provincia de Gerona, en el noreste de España, en 1995 y 2000 (Grau M, *et al.* Eur J Cardiovasc Prev Rehabit. 2007; 14:653-659). Esta es una población con baja incidencia de infarto de miocardio y baja mortalidad por CHD (Masia R, *et al.* J Epidemiol Community Health. 1998; 52:707-715). Se seleccionaron participantes con edades comprendidas entre 35 y 74 años que no tenían CVD y tenían información de ADN y de seguimiento completo disponible para el presente estudio. Este estudio se aprobó por el comité ético local y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. Todos los sujetos eran de ascendencia europea.

65 Selección de variante genética, genotipado y generación de puntuación de riesgo de múltiples loci

Se seleccionaron 9 variantes genéticas, asociadas con CHD pero no con factores de riesgo clásicos, para generar una GRS de múltiples loci tal como se describió anteriormente (Lluís-Ganelia C, *et al.* Rev Esp Cardiol. 2010; 63:925-933). Se seleccionaron variantes genéticas principalmente del catálogo GWAS del National Human Genome Research Institute (Hindorff LA, *et al.* Disponible en: www.genome.gov/26525384) y estaban asociadas con CHD pero no con factores de riesgo cardiovascular según los datos de este catálogo. Las variantes seleccionadas eran: rs17465637 en MICA3 (Samani NJ, *et al.* N Engl J Med. 2007; 357:443-453, Myocardial Infarction Genetics Consortium. Nat Genet. 2009; 41:334-341); rs6725887 en WDR12 (Myocardial Infarction Genetics Consortium. Nat Genet. 2009; 41:334-341); rs9818870 en MRAS (Erdmann J, *et al.* Nat Genet. 2009; 41:280-282); rs12526453 en PHACTR1 (Myocardial Infarction Genetics Consortium. Nat Genet. 2009; 41:334-341); rs1333049 cerca de CDKN2A12B (Samani NJ, *et al.* N Engl J Med. 2007; 357:443-453, Myocardial Infarction Genetics Consortium. Nat Genet. 2009; 41:334-341, Helgadottir A, *et al.* Science. 2007; 316:1491-1493, McPherson R, *et al.* Science. 2007; 316:1488-1491); rs1746048 cerca de CXCL12 (Samani NJ, *et al.* N Engl J Med. 2007; 357:443-453, Myocardial Infarction Genetics Consortium. Nat Genet. 2009; 41:334-341); rs9982601 cerca de SCL5A3 (Myocardial Infarction Genetics Consortium. Nat Genet. 2009; 41:334-341); rs10455872 en LPA (Shiffman D, *et al.* Atherosclerosis. 2010; 212:193-196); y el HaploB (rs10507391, rs9315051, rs17216473, rs17222842) en ALOX5AP (hapB) (Helgadottir A, *et al.* Nat Genet. 2004;36:233-239).

Se obtuvo una GRS de múltiples loci para cada individuo sumando el número de alelos de riesgo (o haplotipo de riesgo) para cada una de las variantes genéticas. Se ponderó esta GRS mediante el tamaño de efecto estimado notificado para cada variante en el estudio CARDIoGRAM (CARDIoGRAM Consortium. Circ Cardiovasc Genet. 2010; 3:475-483).

Se obtuvo el ADN de los participantes de REGICOR de la capa leucocitaria usando métodos normalizados (servicios L'ARS, Barcelona, España) y se genotiparon las muestras usando el chip Cardio inCode (Ferrer inCode, Barcelona, España) basándose en las tecnologías Veracode y KASPar por el Centro Nacional de Investigación Oncológica (CNIO, Madrid, España). El porcentaje global de concordancia del chip con la tecnología de referencia es del 99,9% y la sensibilidad analítica y la especificidad es superior al 98,6%. También se obtuvo información genotípica para los participantes de Framingham mediante dbGaP para variantes genotipadas (chips Affymetrix 500K y 50K) e imputadas (HapMap CEU liberación 22, construcción 36, imputado usando MACH versión 1.00.15). Se excluyeron individuos con bajas tasas de genotipado correcto o incompatibilidades de sexo antes de la imputación en esta base de datos. Además, se usaron altos niveles de ausencia ($p < 10^{-9}$), desviaciones altamente significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 10^{-6}$), o errores mendelianos (> 100) para determinar qué SNP incluir en la etapa de imputación, y también se aplicaron como un criterio de control de calidad para los SNP seleccionados.

35 Seguimiento y definición de fenotipo

Se contactó periódicamente por teléfono o correo con todos los participantes de REGICOR para determinar si habían presentado cualquier acontecimiento cardiovascular hasta el final de 2007. Se identificaron los acontecimientos mortales de los registros de mortalidad regional y nacional. Se revisaron todos los acontecimientos notificados con historias clínicas de hospital o historias clínicas de atención primaria. Un comité de acontecimientos clasificó los posibles acontecimientos de CVD tras la revisión de todas las historias clínicas y las notas de los médicos usando criterios normalizados (Grau M, *et al.* Prev Med. 2010; 51:78-84).

En estos análisis se consideraron dos grupos de acontecimientos: a) acontecimientos de CHD incluido infarto de miocardio, angina de pecho, revascularización coronaria y muerte debida a CHD; y, b) acontecimientos cardiovasculares incluidos acontecimientos de CHD, más accidente cerebrovascular aterotrombótico y arteriopatía periférica.

Se definió el infarto de miocardio basándose en la definición clásica de la OMS por la presencia de 2 de 3 criterios clínicos: nuevas ondas Q de diagnóstico en ECG, molestia torácica isquémica prolongada y elevación de biomarcadores en suero de necrosis miocárdica. Se definió la angina de pecho por la presencia de molestia torácica isquémica con signos de isquemia en el ECG. Se consideraron injertos de revascularización coronaria o intervenciones coronarias percutáneas como procedimientos de revascularización. Se consideró muerte por CHD tras revisar el registro de mortalidad cuando la causa más probable de muerte era CHD y no podía asignarse a ninguna otra causa.

Se definió el accidente cerebrovascular aterotrombótico como un déficit neurológico de inicio súbito focal no embólico de origen vascular que persistió durante más de 24 horas o un infarto isquémico que se documentó en la autopsia. Se definió la arteriopatía periférica por la presencia de síntomas de claudicación y una prueba de diagnóstico objetiva tal como un índice tobillo-brazo patológico ($< 0,9$) o una arteriografía patológica o procedimiento de revascularización.

Estimación del riesgo cardiovascular en 10 años

La función de riesgo usada en este estudio fue la adaptación REGICOR validada y calibrada de la función de FRAMINGHAM para la prevalencia de factores de riesgo e incidencia de acontecimiento coronario de la población

española (Marrugat J, *et al.* J Epidemiol Community Health. 2003; 57(8):634-638).

5 Se midieron todos los factores de riesgo cardiovascular requeridos para las funciones de riesgo usando métodos convencionales. Se consideró que los participantes eran diabéticos si se les había diagnosticado diabetes o tratado con insulina o agentes hipoglucémicos orales o presentaban una glucemia mayor o igual a 126 mg/dl. Aquellos que notificaron tabaquismo ≥ 1 cigarrillo/día en el año anterior se consideraron fumadores. Se recogieron todas las mediciones de lípidos y tensión arterial de nivel inicial necesarias y se usaron para estimar el riesgo de cada participante.

10 **Análisis estadístico**

Se usaron métodos paramétricos y no paramétricos clásicos para comparar las características de diferentes grupos de individuos según la presencia de un acontecimiento de CDV/CHD durante el seguimiento y dentro de los diferentes quintiles de la puntuación de riesgo genético (GRS).

15 Se sometió a prueba la asociación entre las variantes genéticas individuales o la GRS de múltiples loci y la incidencia de acontecimientos cardiovasculares o coronarios usando modelos de riesgo proporcionales Cox; se consideró la GRS como una variable continua o se categorizó según sus quintiles. Se ajustaron todos los modelos mediante la suma del producto de cada factor de riesgo clásico y se calculó su coeficiente estimado en las funciones de riesgo REGICOR en cada individuo. Se sometió a prueba la hipótesis de riesgos proporcionales usando la función `cox.zph` del paquete `survival` de R.

Se usaron dos diferentes estadísticas para evaluar el valor potencial de incluir la GRS en la predicción de riesgo:

25 a) para evaluar la bondad de ajuste de los modelos se usó una versión de la prueba de Hosmer-Lemeshow que tiene en cuenta la correcta censura de los datos (D'Agostino RB, Nam BH. Handbook of Statistics. 2003; Vol 23:1-25);

30 b) para evaluar la reclasificación se calculó la mejora de reclasificación neta (NRI) (Pencina MJ, *et al.* Stat Med. 2001; 30:11-21) en toda la muestra y en el subgrupo de individuos que se consideró que tenían riesgo coronario intermedio según la función de riesgo clásica. Se definieron tres categorías de riesgo (bajo, intermedio y alto) 0-4,9%, 5,0-14,9%, $\geq 15\%$, respectivamente. Para calcular el número de acontecimientos esperados en 10 años en cada categoría de riesgo, se usaron las estimaciones de Kaplan-Meier tal como propusieron Steyerberg y Pencina (Steyerberg EW, Pencina MJ. Ann Intern Med. 2010; 152(3):195-196). Se usó un método bootstrap para obtener intervalos de confianza para NRI para tener en cuenta la incertidumbre de las estimaciones de Kaplan-Meier.

Todos los análisis se llevaron a cabo usando el paquete estadístico R (versión 2.11.1).

40 **Resultados**

Descripción de las poblaciones estudiadas

45 El número de los participantes incluidos fue de 2.760 de la cohorte de REGICOR. Las características de los participantes en la cohorte, y mediante presencia de acontecimientos de CVD/ CHD se muestran en la tabla G (figura 3).

50 La razón de riesgo de acontecimiento de CVD/CHD se presenta para cada factor de riesgo cardiovascular en la tabla H. Como se esperaba, todos factores de riesgo clásicos, excepto el tabaquismo y los antecedentes familiares de CHD, se asociaron con un riesgo aumentado de acontecimientos de CVD y CHD en la cohorte de REGICOR.

Tabla H. Razón de riesgo de factores de riesgo clásicos para acontecimientos cardiovasculares y para acontecimientos coronarios.

	Acontecimiento cardiovascular		Acontecimiento coronario	
	HR [IC del 95%]	valor de p	HR [IC del 95%]	valor de p
REGICOR				
Edad (10 años)	1,94 [1,62-2,32]	<0,001	1,98 [1,60-2,45]	<0,001
Sexo (hombres)	1,85 [1,28-2,63]	<0,001	1,89 [1,22-2,86]	0,002
Colesterol total (10 mg/dl)	1,06 [1,02-1,10]	0,005	1,05 [1,01-1,10]	0,027
Colesterol-HDL (10 mg/dl)	0,63 [0,54-0,74]	<0,001	0,57 [0,47-0,69]	<0,001
BP sistólica (10 mmHg)	1,35 [1,25-1,45]	<0,001	1,37 [1,25-1,50]	<0,001
BP diastólica (10 mmHg)	1,32 [1,13-1,55]	0,001	1,39 [1,16-1,69]	0,001
Diabetes	2,11 [1,41-3,14]	<0,001	2,70 [1,72-4,23]	<0,001
Fumador	1,10 [0,73-1,65]	0,638	1,23 [0,77-1,97]	0,383

Antecedentes familiares de CVD*	1,35 [0,86-2,14]	0,191	1,47 [0,86-2,49]	0,160
Riesgo coronario†	1,13 [1,11-1,16]	<0,001	1,14 [1,12-1,17]	<0,001

* CVD: Enfermedad cardiovascular.

† Se calculó el riesgo coronario usando la función calibrada de Framingham para la cohorte de REGICOR.

Las características de los participantes dentro de cada quintil de la GRS se muestran en la tabla I. La puntuación no se asoció con ninguno de los factores de riesgo clásicos incluidos en la función de riesgo calibrada de Framingham, excepto para los antecedentes familiares de CHD.

5 Tabla I. Descripción de las características de los participantes a través de los quintiles de puntuación de riesgo genético.

Variables	Quintiles de puntuación genética					valor de p	tendencia de p
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5		
N	552	544	582	582	510		
Edad (años)*	54,0 (11,2)	53,2 (11,0)	54,2 (11,1)	54,1 (11,3)	53,9 (11,1)	0,550	0,645
Sexo (hombres)†	266 (48,2)	269 (48,6)	252 (44,8)	285 (49,0)	255 (50,0)	0,463	0,521
Colesterol total (10 mg/dl)*	222 (44,1)	227 (42,1)	227 (41,8)	230 (43,2)	224 (42,0)	0,048	0,189
Colesterol-HDL (10 mg/dl)*	51 (12,5)	52 (13,1)	53 (14,3)	51 (12,9)	51 (13,5)	0,031	0,633
SBP (mmHg)*	133 (22,0)	131 (20,0)	133 (20,2)	133 (22,0)	132 (19,4)	0,539	0,696
DBP (mmHg)*	79 (10,4)	79 (10,8)	79 (10,0)	80 (10,4)	80 (10,0)	0,581	0,101
Diabetes‡	70 (13,0)	79 (14,6)	90 (16,4)	83 (14,6)	62 (12,4)	0,357	0,831
Tabaquismo‡	115 (21,2)	121 (21,9)	124 (22,2)	135 (23,5)	121 (24,2)	0,775	0,124
Antecedentes familiares de CHD†	45 (8,2)	61 (11,2)	76 (13,5)	74 (12,8)	68 (13,5)	0,033	0,001
Riesgo coronario‡	3,4 (1,8- 6,5)	3,2 (1,6- 5,7)	3,6 (1,7- 6,5)	3,5 (1,8- 6,6)	3,4 (1,9- 6,1)	0,427	0,312
Incidencia de acontecimientos cardiovasculares §	6,41	8,12	5,16	8,46	7,90	0,068	0,027
Incidencia de acontecimientos coronarios§	4,38	5,69	3,34	6,20	7,52	0,088	0,034

HDL: lipoproteína de alta densidad; SBP: tensión arterial sistólica; DBP: tensión arterial diastólica; CHD: cardiopatía coronaria.

* media (desviación estándar); † n (proporción, %); ‡ media (intervalo de confianza del 95%); § número de casos/100 individuos en 10 años.

10 La GRS ajustada para riesgo coronario mostró una asociación estadísticamente significativa con incidencia de CHD y CVD cuando se consideró como una variable continua (tabla J). Se observó una asociación lineal con un aumento de acontecimientos de CVD y CHD del 12% (IC del 95%: 1%; 24%) y de 15% (IC del 95%: 2%; 30%) por unidad de la GRS, respectivamente (tabla J). Esta asociación permaneció estadísticamente significativa con ajuste adicional para antecedentes familiares de CHD. Los participantes en el quintil superior de GRS tenían riesgo de CVD y CHD aumentado 1,71 veces y 1,81 veces, respectivamente, en comparación con el quintil inferior (valor de p para tendencia lineal <0,025 y 0,039) (tabla J).

15 Tabla J. Asociación ajustada de múltiples variables de la puntuación de riesgo genético con acontecimientos cardiovasculares y coronarios como una variable lineal y a través de quintiles.

	Puntuación de riesgo genético	REGICOR	
		HR [IC del 95%]	Valor de p
Acontecimientos cardiovasculares	Lineal	1,12 [1,01-1,24]	0,038
	Quintiles	Tendencia de p	0,025
	Q1	1	---

	Q2	1,26 [0,69-2,30]	0,450
	Q3	0,84 [0,44-1,57]	0,575
	Q4	1,59 [0,92-2,78]	0,099
	Q5	1,71 [0,97-3,03]	0,006
	Lineal	1,15 [1,02-1,30]	0,027
Acontecimientos coronarios	Quintiles	Tendencia de p	0,039
	Q1	1	---
	Q2	1,11 [0,54-2,28]	0,774
	Q3	0,72 [0,34-1,54]	0,398
	Q4	1,45 [0,76-2,79]	0,263
	Q5	1,81 [0,94-3,48]	0,074

Se ajustaron todos los modelos mediante la suma del producto de cada factor de riesgo clásico y su coeficiente estimado en la función de riesgo REGICOR calibrada de Framingham. * HR [IC del 95%]: Razón de riesgo [intervalo de confianza del 95%].

5 En la figura 1 se presenta la distribución de la puntuación de riesgo genético en participantes de REGICOR según la incidencia de acontecimientos cardiovasculares (a) y coronarios (b) durante el seguimiento. La puntuación de riesgo genético se representa en el eje de ordenadas (eje X) y se calcula como una suma acumulativa de todos los alelos de riesgo que porta una persona, ponderados mediante el efecto de cada SNP, y que teóricamente oscilan entre 0 y 18 copias.

10 La prueba de bondad de ajuste para los modelos para CHD mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow indicó que la calibración era buena en la cohorte de REGICOR con y sin GRS ($\chi^2=4,39$; valor de $p=0,222$ y $\chi^2=5,58$; valor de $p=0,232$, respectivamente).

15 Análisis de mejora de predicción de riesgo

20 La tabla K muestra la reclasificación de riesgo lograda con la inclusión de GRS en la función de riesgo de Framingham para acontecimientos de CVD y CHD. Cuando se consideró el subgrupo de riesgo intermedio, la NRI aumentó en ambas cohortes y para ambos resultados. En el metanálisis, la NRI fue 10,32 [IC del 95%: 2,48; 18,17] y de 14,36 [IC del 95%: 5,14; 24,12] para acontecimientos de CVD y CHD para el grupo de riesgo intermedio, respectivamente. Los resultados de una GRS con los 4 SNP más informativos (rs6725887, rs9818870, rs1333049 y haplotipo de LPA [rs3798220 y rs10455872]) fueron similares y se describen en la tabla L.

25 Tabla K. Reclasificación de individuos basada en el riesgo de cardiopatía coronaria previsto para 10 años con y sin la puntuación de riesgo genético. Las categorías de riesgo se definieron usando recomendaciones nacionales. En REGICOR, los puntos de corte para riesgo bajo, intermedio y alto eran del 0-4,9%, 5-14,9% y $\geq 15\%$.

REGICOR				
Acontecimientos cardiovasculares	Función clásica + Puntuación de riesgo genético			
	Función clásica	Riesgo bajo	Riesgo intermedio	Riesgo alto
	Casos			
	Riesgo bajo	64	6	0
	Riesgo intermedio		89	5
	Riesgo alto	0		22
	No casos			
	Riesgo bajo	1669		0
	Riesgo intermedio	77	648	
	Riesgo alto	0	19	57
Acontecimientos coronarios	Función clásica + Puntuación de riesgo genético			
	Función clásica	Riesgo bajo	Riesgo intermedio	Riesgo alto
	Casos			
	Riesgo bajo	43	6	0
	Riesgo intermedio		68	6
	Riesgo alto	0	0	16
	No casos			
	Riesgo bajo	1671		0
	Riesgo intermedio	92	642	
	Riesgo alto	0	25	61

NRI	Acontecimiento cardiovascular	Riesgo intermedio
	Acontecimiento coronario	10,66 [3,90;17,43] 14,52 [5,27;23,78]

5 Tabla L. Reclasificación de individuos basada en el riesgo de cardiopatía coronaria previsto en 10 años con y sin la puntuación de riesgo genético. Se definieron las categorías de riesgo usando recomendaciones nacionales. En REGICOR, los puntos de corte para riesgo bajo, intermedio y alto eran del 0-4,9%, 5-9,99%, 10-14,99 % y ≥15%.

	Más puntuación genética							
	Coronaria				Vascular			
Sólo clásico	<=0,05	(0,05, 0,10]	(0,10, 0,15]	>0,15	<=0,05	(0,05, 0,10]	(0,10, 0,15]	>0,15
Casos								
(-Inf,0,05]	43,3	5,7	0,0	0,0	61,0	9,3	0,0	0,0
(0,05,0,10]	1,4	38,4	8,1	0,0	0,4	52,7	10,4	0,0
(0,10,0,15]	0,0	3,6	18,3	5,8	0,0	5,7	21,4	5,3
(0,15, Inf]	0,0	0,0	0,0	16,3	0,0	0,0	5,5	19,7
Controles								
(-Inf,0,05]	1695,0	89,3	0,0	0,0	1698,1	64,9	0,0	0,0
(0,05,0,10]	92,3	468,0	55,8	1,0	77,3	484,3	39,8	0,0
(0,10,0,15]	0,0	34,2	103,7	20,7	0,0	25,6	113,0	15,3
(0,15, Inf]	0,0	0,0	27,6	59,5	0,0	0,0	19,5	58,6

NRI	Coronaria	Vascular
TODOS	9,95 [1,02;18,89]	18,22 [3,71;32,72]
Riesgo moderado (10-20%)	7,10 [-1,98;16,18]	16,37 [3,17;29,57]

10 Discusión

15 Siguiendo la declaración de la AHA para la evaluación del valor de marcadores de riesgo nuevos (Hlatky MA, *et al.* Circulation. 2009; 119:2408-2416), se ha validado la asociación entre una GRS de múltiples loci y la incidencia de acontecimientos de CVD y CHD en una cohorte basada en la población prospectiva. Además, también se ha mostrado la capacidad de esta GRS cuando se añade a la función de riesgo calibrada de Framingham para mejorar la predicción de acontecimientos de CVD y CHD, particularmente en aquellos individuos con riesgo intermedio.

Validación prospectiva de la asociación entre una puntuación de riesgo genético de múltiples loci nueva y acontecimientos de CVD o CHD

20 Se notifica que una GRS de múltiples loci, compuesta por variantes genéticas principalmente identificadas mediante GWAS y no relacionadas con factores de riesgo cardiovascular clásicos, está lineal y directamente asociada con la incidencia de acontecimientos de CVD y CHD en la cohorte de REGICOR. También se confirma que los tamaños de efecto para estas variantes son de aproximadamente el 10% de riesgo aumentado para CVD y CHD por unidad de la GRS y que eran independientes de los antecedentes familiares de CHD.

25 Este tamaño de efecto es más pequeño que el notificado en estudios de descubrimiento de casos-contróles, lo que probablemente se debe a la tendencia de los estudios de casos-contróles de sobreestimar el tamaño real del efecto de las asociaciones notificadas. Esta sobreestimación también podría explicarse por el efecto de la "maldición del ganador" de los estudios de descubrimiento, o la inclusión de una definición extrema de casos y contróles en estos estudios.

30 De manera similar a los factores de riesgo de CVD clásicos (D'Agostino RB, *et al.* JAMA. 2001; 286(2):180-187), el tamaño del efecto de la GRS parece ser comparable a través de poblaciones con diferente riesgo absoluto. Además, este tamaño de efecto es similar al de algunos factores de riesgo cardiovascular clásicos (Wilson PW, *et al.* Circulation. 1998; 97(18):1837-1847).

35 Los resultados son mejores que los notificados por Paynter *et al* en una cohorte prospectiva de 19.313 mujeres blancas inicialmente sanas en el Women's Genome Health Study (estudio de salud del genoma de la mujer (Paynter NP, *et al.* JAMA. 2010; 303:631-637). En ese estudio, los autores obtuvieron una GRS de múltiples loci con 11 SNP asociados con CHD en GWAS, que no se asoció con la incidencia de CVD.

Valor incremental de la puntuación de riesgo genético para la predicción de riesgo de CVD y CHD

45 El estudio es distintivo en el sentido de que sólo se incluyó en la GRS aquellas variantes que eran independientes de factores de riesgo clásicos con el fin de incorporar información complementaria a la ya incluida en las funciones de riesgo (Thanassoulis G, *et al.* Circulation. 2010; 122:2323-2334). La inclusión de la GRS en las funciones de riesgo

clásicas mejoró la clasificación de los individuos en las diferentes categorías de riesgo, especialmente en aquellos individuos con riesgo intermedio.

5 La evaluación de la mejora de los modelos predictivos debe considerar métricas de reclasificación de riesgo tales como NRI.

Desde una perspectiva clínica, la baja sensibilidad de las funciones de riesgo ya se ha documentado de tal manera que el 50% de los acontecimientos de CHD se producen en la población con riesgo coronario intermedio (Marrugat J, *et al.* J Epidemiol Community Health. 2007; 61:40-47). Por tanto, el grupo de riesgo intermedio puede beneficiarse el que más de pruebas orientadas a estratificar el riesgo de CHD de manera más precisa. Esto ayudará a seleccionar la población objeto para medidas preventivas más agresivas. En el estudio se observó que la GRS mejoró la clasificación de individuos principalmente en las categorías de riesgo intermedio.

15 De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la consideración responsable en la práctica clínica de la información proporcionada por la puntuación de riesgo genético podría ser:

Primero, identificar pacientes de riesgo cardiovascular alto. Están disponibles diversas directrices para la prevención primaria de enfermedad cardiovascular. Si cada persona pudiese recibir la terapia de prevención para la que es candidata, los infartos de miocardio podrían reducirse en $\geq 60\%$, los accidentes cerebrovasculares podrían reducirse en un 30% y la esperanza de vida de cualquiera podría aumentarse en un promedio de 1,3 años y con una calidad de vida mayor de la realmente experimentada, (Circulation 2008; 118:576). Según el trabajo realizado por Vancheri F *et al.* (Eur J Inter Med 2009; 20:601-606), en la práctica clínica, una gran proporción de médicos que lidian con prevención cardiovascular primaria clasifican de manera insuficiente el nivel de riesgo de sus pacientes. Además, cuando se analizó la decisión de comenzar el tratamiento farmacológico, en algunos casos se inició el tratamiento en pacientes de riesgo alto (FRS $>20\%$) mientras que en otros se inició con FRS $<20\%$ resultando influida la decisión por factores no directamente relacionados con el riesgo del paciente individual. Se cree firmemente que debe usarse el poder de reclasificación de la puntuación de riesgo genético para identificar pacientes ubicados en el estado de riesgo moderado mediante las funciones de riesgo clásicas que deberían asignarse en el estado de riesgo alto y para los cuales deberían implementarse medidas preventivas. Especialmente cuando la mayoría de los infartos de miocardio se producen en pacientes que se habían clasificados previamente como de riesgo moderado. Por esta razón son muy alentadores los excelentes resultados de reclasificación obtenidos con la puntuaciones de riesgo genético de cuatro SNP en los pacientes de riesgo moderado-alto.

Segundo, comparar el riesgo cardiovascular sin y con la puntuación de riesgo genético. Se trata de un concepto similar al riesgo relativo promulgado por las directivas europeas sobre enfermedad cardiovascular (Eur J Cardiovas Prev Reha 2007; 14 (Supl 2):e1-e40). A pesar del valor de su riesgo absoluto, considerando los marcadores de riesgo genético este valor podría ser significativamente más alto. Esto es especialmente útil, aunque no exclusivamente, para personas jóvenes o cuando el desarrollo completo de los factores de riesgo clásicos no está aún presente o cuando el riesgo no asociado con los factores de riesgo clásicos es muy relevante. En la misma línea, se ha sugerido que funciones en 10 años pueden subestimar la verdadera carga de riesgo, particularmente en individuos más jóvenes destacando la necesidad de modelos de predicción de riesgo cardiovascular a largo plazo. Estos modelos a largo plazo también son valiosos para fines educativos ya que pueden usarse para enseñar a los pacientes cómo pueden modificarse sus riesgos si cumplen los objetivos del tratamiento. Es útil destacar la gran utilidad de las puntuaciones genéticas en este campo. La puntuación de riesgo genético confirió un riesgo comparable a otros factores de riesgo establecidos tales como colesterol-LDL en plasma o tensión arterial sistólica.

Tercero, adaptar la intensidad del tratamiento o los objetivos de tratamiento al nivel de riesgo. La intensidad de cualquier acción contra los factores de riesgo debe ajustarse a la gravedad del riesgo. La reclasificación de los pacientes a riesgo moderado podría ayudar al médico a establecer tanto la intensidad como los objetivos del tratamiento.

Cuarto, mejorar el cumplimiento del tratamiento. En promedio, de una séptima parte a la mitad de los pacientes no cumplen las pautas de tratamiento recetadas (Munger MA, *et al.* MedGenMed 2007; 9:58, Gamer JB Am J Cardiol 2010; 105:1495-1501). El conocimiento de una enfermedad basada en genética ha demostrado aumentar el cumplimiento con los medicamentos (Umans-Eckenhausen MA, *et al.* Lancet 2001; 357:165-168). Las puntuaciones del riesgo genético podrían usarse para el cumplimiento del tratamiento.

Conclusiones

60 Una puntuación de riesgo genético (GRS) de múltiples loci basada en variantes genéticas no relacionadas con factores de riesgo cardiovascular clásicos está directa y linealmente asociada con el riesgo de acontecimientos de CVD en dos poblaciones diferentes. Esta puntuación genética se ha validado y se ha documentado el valor incremental cuando se añade a marcadores de riesgo convencionales usando las cohortes de Regicor y Framingham. Estos resultados destacan el valor de esta puntuación de riesgo genético validada con respecto a otros marcadores genéticos publicados hasta ahora.

Lista de secuencias

	<110> Gendiag.Exe, S.L.	
5	<120> Enfermedad cardiovascular	
	<130> 147 516	
	<160> 34	
10	<170> PatentIn versión 3.4	
	<210> 1	
	<211> 53	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
20	accataataa gttatgctga gaagttcttt ttgtcatag tgcaagataa cat	53
	<210> 2	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 2	
	gctatcattt aaatttggt gagacacaat atgctgtgc actttctata aa	52
	<210> 3	
30	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
35	ctgtgctgct tggcctct ctgatgaa tacactgaca cgtcaaagta ac	52
	<210> 4	
	<211> 52	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
	acatctgct ctctagacta taaactctt gggctaggt cttcttgc tt	52
45	<210> 5	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 5	
	tcatactaac catatgatca acagttcaaa agcagccact cgcagagcta ag	52
	<210> 6	
	<211> 53	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
60	gaagggtaaa ggggtgtagg attgagcgag tcaggccaga aacctctagt tag	53
	<210> 7	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 7	

ES 2 573 648 T3

	ggcaagtacc tgggcacagg gctgcttcat ggccttgac ctggacagtg ga	52
	<210> 8	
	<211> 52	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
10	ttcagacacc ttgttctcag aacccaatgt gttatacag gtagaggag aa	52
	<210> 9	
	<211> 52	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9	
	ctgacctcag gtgatctgcc tgcctcagcc tcccacagtt ttgtgattat ag	52
	<210> 10	
20	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
25	tgtccaagcc tctcttgca attctaatta acctcaatgt tgcaaccata ga	52
	<210> 11	
	<211> 52	
30	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11	
	ctcatgaaca tgacttgaa caggaaaaca gggagagaat gaagctggcc aa	52
35	<210> 12	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 12	
	gagtttctt gggatgtggt ccttcggtt ttttaaaaat tattttatt ga	52
	<210> 13	
45	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
50	acagtttta ctgtaactgc caataataa tactcatctt taaaagaca tc	52
	<210> 14	
	<211> 53	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
	cacactgtct ttgccgtcat tgaactcgca acctactgc tgagtgagga cac	53
	<210> 15	
60	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 15	
65	gcatgctctg caccctgca gagcgcgtgt gataatgcat tgctaagtct tg	52

ES 2 573 648 T3

	<210> 16	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 16	
	atacagtccc attctgagga actgagagta aagattcaac atatgaattt tg	52
	<210> 17	
10	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
15	acctcaccaa ccgaggagga attgctagat gagatccttc ccccgaatt tc	52
	<210> 18	
	<211> 52	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 18	
	gctagtctct tccccagcc actgttacc agtgggctta catatatcat gg	52
25	<210> 19	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 19	
30	ggctccaaga acagcctaga cactctatt tcctgaacat gagattcgag gt	52
	<210> 20	
	<211> 53	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20	
40	accagatctt cgagttgtca tcccccttc aagcaagggc atgatgcctc cac	53
	<210> 21	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 21	
	agcaagagct gaagtcaggc agtggttaact acttttct gaaaacttag tg	52
	<210> 22	
50	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 22	
55	aggctctgtt ttctaagaa ccttgagcag ctgaaccggg attggaacct ct	52
	<210> 23	
	<211> 52	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
	tctccaaggg ctgagaactt cggtgacttc atccacctgt ctattgcac at	52
65	<210> 24	
	<211> 52	

ES 2 573 648 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 24
 5 tggggctagc agcctctggc tcaggacggt caacaggact ggaagagtcc ca 52

 <210> 25
 <211> 52
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <400> 25
 fttgcaagcg tcggcctttc acggaactg ggaactaaa atgtagcctg ag 52

 <210> 26
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 26
 20 ggggctagga cctacactcc cagccacgta ctctgctcct gcctgggagg tg 52

 <210> 27
 <211> 52
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*

 <400> 27
 ggctccagt gtaccagag ctggagtctc gacgggagcg ttgggagcag cg 52

 <210> 28
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 28
 35 tgctgtcac accttggctf ctgaggaag gatcagtgtg taaaagaggg ga 52

 <210> 29
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 29
 45 cctagggctc acagcaccaa acacagattg aatgcacaac gaatgaatga at 52

 <210> 30
 <211> 52
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*

 <400> 30
 ttgtactacc cagctcttcc cccatcccgt tactcttgac attaactatg ct 52

 <210> 31
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 31
 60 tctcaaaca tgaaaataaa acagtagaaa cagaaaaata tatttccta aa 52

 <210> 32
 <211> 52
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 573 648 T3

	<400> 32 cgacactcc aaatgtggga cgttgacaa gttactaac cttccatgc cc	52
5	<210> 33 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 33 ttatgggtac ctaagtatta gcagcacgca atagagatac tagattgga cc	52
	<210> 34 <211> 52	
15	<212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 34 atctgtgcct ggtcccagtg cagcaccaaa ggcaaacaca gtgttaggaa gg	52
20		

REIVINDICACIONES

1. Método para una evaluación del riesgo cardiovascular en un sujeto, que comprende las etapas de determinar en una muestra aislada de dicho sujeto la presencia de polimorfismos en las posiciones 27 dentro de cada una de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 12, en el que la presencia en la posición 27 de C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, G en SEQ ID NO: 8, A en SEQ ID NO: 9, A en SEQ ID NO: 10, A en SEQ ID NO: 11, y G en SEQ ID NO: 12, constituyendo las cuatro últimas el haplotipo B de ALOX5AP, es indicativa de un riesgo de padecer un acontecimiento cardiovascular, en el que el acontecimiento cardiovascular se selecciona del grupo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular aterotrombótico, angina de pecho, revascularización coronaria debida a cardiopatía coronaria y arteriopatía periférica mortales o no mortales.
2. Método de determinación de la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina de pecho mortal o no mortal en un periodo de 10 años basándose en la presencia de 1 a P factores de riesgo clásicos y 1 a J polimorfismos en las posiciones 27 en las secuencias de nucleótidos de cada una de SEQ ID NO: 1 a 12, en el que se determina la presencia en la posición 27 en cada una de SEQ ID NO: 1 a 12, en el que el alelo de riesgo en la posición 27 es C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, G en SEQ ID NO: 8, A en SEQ ID NO: 9, A en SEQ ID NO: 10, A en SEQ ID NO: 11 y G en SEQ ID NO: 12, constituyendo las cuatro últimas el haplotipo B de ALOX5AP, y en el que se calcula la probabilidad usando la fórmula:

$$1 - \hat{S}^{\exp \left[\sum_{p=1}^P \beta_{CRF_p} * CRF_{p,i} + \sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * SNP_{j,i} - \sum_{p=1}^P \beta_{CRF_p} * \overline{CRF_p} - \sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * \overline{SNP_j} \right]}$$

en la que,

- \hat{S} es la supervivencia media libre de acontecimientos coronarios en la población,
- $\sum_{p=1}^P$ es la función sumatoria a lo largo de los P factores de riesgo clásicos,
- β_{CRF_p} es el logaritmo de la razón de riesgo que corresponde al factor de riesgo coronario clásico "p" que se muestra en la tabla A,
- $CRF_{p,i}$ es el valor de cada factor de riesgo coronario "p" incluido en la ecuación para un individuo "i",
- $\sum_{j=1}^J$ es la función sumatoria a lo largo de las J variantes genéticas,
- β_{SNP_j} es el logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la variante genética "j" tal como se muestra en la tabla B,
- $SNP_{j,i}$ es el número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para una variante genética específica "j" incluidos en la ecuación para un individuo "i",
- $\overline{CRF_p}$ es el valor promedio para el factor de riesgo clásico "p" en la población,
- $\overline{SNP_j}$ es el número de copias de alelo de riesgo promedio para la variante genética "j" en la población.

3. Método de determinación de la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina de pecho mortal o no mortal en un periodo de 10 años basándose en la presencia de 1 a P factores de riesgo clásicos diferentes y 1 a Q variantes genéticas diferentes en el que dicha variante genética es un polimorfismo que se determina en las posiciones 27 en todas las secuencias de nucleótidos de cada una de SEQ ID NO: 1 a 12, en el que el alelo de riesgo en la posición 27 es C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, G en SEQ ID NO: 8, A en SEQ ID NO: 9, A en SEQ ID NO: 10, A en SEQ ID NO: 11 y G en SEQ ID NO: 12, constituyendo las cuatro últimas el haplotipo B de ALOX5AP, y en el que se calcula la probabilidad usando la fórmula:

$$1 - \hat{S} \exp \left[\sum_{p=1}^P \beta_{CRF_p} * CRF_{p,i} + \beta_{GRS} * GRS_i - \sum_{p=1}^P \beta_{CRF_p} * \overline{CRF_p} - \beta_{GRS} * \overline{GRS} \right]$$

en la que

5 \hat{S} : supervivencia media libre de acontecimientos coronarios en la población,

exp: exponenciación natural,

10 $\sum_{p=1}^P \beta_{CRF_p} * CRF_{p,i}$: donde

$\sum_{p=1}^P$ función sumatoria a lo largo de los P factores de riesgo clásicos de la tabla C,

β_{CRF_p} logaritmo de la razón de riesgo que corresponde al factor de riesgo coronario clásico “p”, los valores de β para cada factor de riesgo coronario “p” se muestran en la tabla C,

15 $CRF_{p,i}$: valor de cada factor de riesgo coronario “p” incluido en la ecuación para un individuo “i”,

20 β_{GRS} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a un aumento de una unidad en el valor de la puntuación de riesgo genético, el valor de este β_{GRS} es de 0,104 con un intervalo de valores que van desde 0,010 hasta 0,500,

$\overline{CRF_p}$: valor promedio para el factor de riesgo clásico “p” en la población,

\overline{GRS} : valor medio de la puntuación de riesgo genético en la población.

25 4. Método de determinación de la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina de pecho mortal o no mortal en un periodo de 10 años basándose en la presencia de factores de riesgo clásicos diferentes y 1 a Q variantes genéticas diferentes en el que dicha variante genética es un polimorfismo que se determina en las posiciones 27 en todas las secuencias de nucleótidos de cada una de SEQ ID NO: 1 a 12, en el que el alelo de riesgo en la posición 27 es C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 2, T en SEQ ID NO: 3, C en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, C en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, G en SEQ ID NO: 8, A en SEQ ID NO: 9, A en SEQ ID NO: 10, A en SEQ ID NO: 11 y G en SEQ ID NO: 12, constituyendo las cuatro últimas el haplotipo B de ALOX5AP, y en el que se calcula la probabilidad usando las etapas de:

35 (i) calcular la combinación lineal de factores de riesgo w_i usando la función

$$w_i = \beta_{col} * (colesterol_i - 6) + \beta_{SBP} * (SBP_i - 120) + \beta_{fumador} * actual_i + \sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * (SNP_{i,j} - \overline{SNP_{i,j}})$$

40 en la que

$colesterol_i$: nivel de colesterol para el individuo “i” en mmol/l,

45 β_{col} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde al colesterol (tabla E),

SBP_i : tensión arterial sistólica para el individuo “i” en mmHg,

β_{SBP} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la tensión arterial sistólica (tabla E),

50 $actual_i$: estado de tabaquismo actual para el individuo “i” (1: actual, 0: anterior/nunca),

$\beta_{fumador}$: logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la tensión arterial sistólica (tabla E),

$$\sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * (SNP_{i,j} - \overline{SNP_{i,j}}) :$$

$\sum_{j=1}^J$ función sumatoria a lo largo de las J variantes genéticas,

β_{SNP_j} logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la variante genética "j", el posible intervalo de valores de β para cada variante genética "j" se muestra en la tabla B,

$SNP_{j,i}$: número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para una variante genética específica "j" incluidos en la ecuación para un individuo "i",

$\overline{SNP_j}$: número de copias de alelo de riesgo promedio para la variante genética "j" en la población,

(ii) calcular la supervivencia de nivel inicial S_0 para una edad dada usando la función

$$S_0(\text{edad}) = \exp\{-\exp(\alpha) \cdot (\text{edad} - 20)^p\}$$

$$S_0(\text{edad} + 10) = \exp\{-\exp(\alpha) \cdot (\text{edad} - 10)^p\}$$

en la que

α, p : parámetros de forma y escala de la distribución de Weibull en la que sus valores se muestran en la tabla F (parámetros)

\exp : exponenciación natural,

(iii) calcular la supervivencia en 10 años $S_{10}(\text{edad})$ usando la función

$$S(\text{edad}) = \{S_0(\text{edad})\}^{\exp(w)}$$

$$S(\text{edad} + 10) = \{S_0(\text{edad} + 10)\}^{\exp(w)}$$

$$S_{10}(\text{edad}) = S(\text{edad} + 10) / S(\text{edad})$$

(iv) calcular la probabilidad de padecer el acontecimiento durante el seguimiento de 10 años

$Riesgo_{10}(\text{edad})$ usando la función,

$$Riesgo_{10}(\text{edad}) = 1 - S_{10}(\text{edad})$$

y

(v) calcular la probabilidad de padecer un acontecimiento cardiovascular durante el seguimiento de 10 años como la suma del riesgo cardiovascular coronario y no coronario usando la función

$$CVD_{Riesgo_{10}} = [CHDRiesgo_{10}(\text{edad})] + [No-CHDRiesgo_{10}(\text{edad})]$$

5. Método según la reivindicación 1, que comprende además determinar uno o más factor(es) de riesgo de enfermedad o trastorno cardiovascular seleccionado(s) del grupo que consiste en edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, estado de tabaquismo, nivel de colesterol-lipoproteínas de baja densidad (LDL) o -lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, antecedentes de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal, hipertrofia ventricular izquierda, antecedentes de consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, antecedentes de ejercicio, dieta y antecedentes familiares de enfermedad o trastorno cardiovascular.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra es una muestra de tejido oral, raspado, o lavado, o una muestra de líquido biológico, preferiblemente saliva, orina o sangre.
7. Método según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la presencia o ausencia del polinucleótido se identifica mediante la amplificación o no amplificación de 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 el SNP se identifica hibridando la muestra de ácido nucleico con un marcador de cebador que es un resto detectable.
8. Programa informático adaptado para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7

o medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

- 5 9. Kit que consiste en reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 dentro de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1 a 12, en el que los reactivos consisten en todos aquellos pares de cebadores específicos para la amplificación de una región que comprende al menos la posición 27 dentro de cada una de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 12.

Figura 1

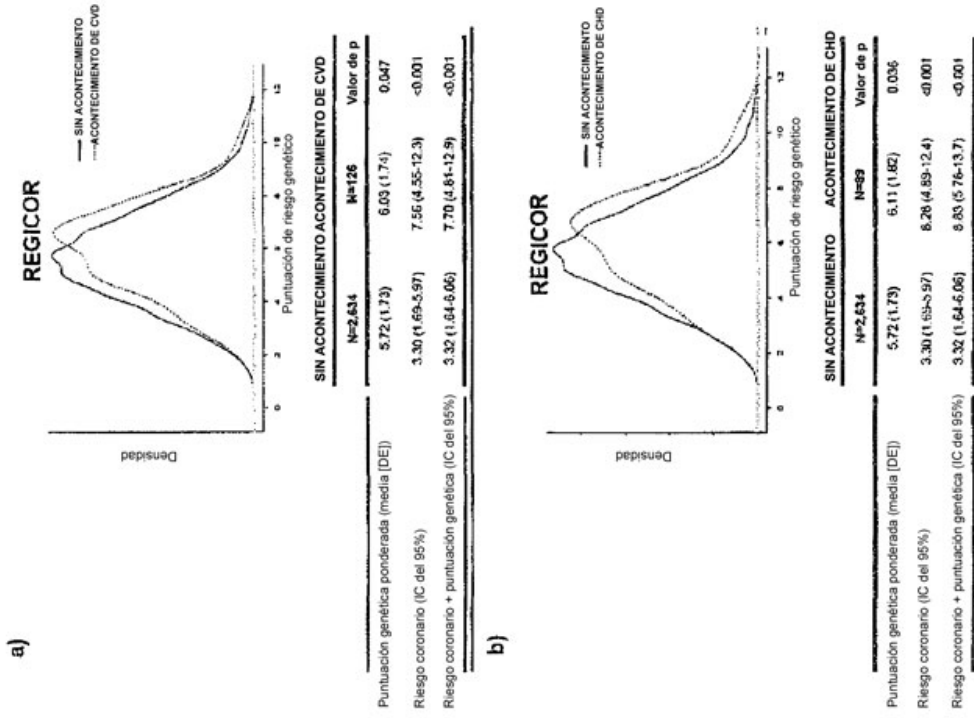


Figura 2

Tabla 1

1	ACCAATAAAGTATGCTGAGAAAGTCTTTTTTTCATAGTGCAGATAACAT	rs17465637	C	1	196042601	+	AC_000046403.03.2008
2	GCTATCATTTAAATTTGGTTGAGACACAATATGCTGTGCACCTTCTATAAA	rs6725987	C	2	197498571	+	AC_000046403.03.2008
3	CTGTGCTGTGGTGGCTCTCTGATGATGAATACACTGACACGTTCAAAGTAAAC	rs9618870	T	3	136547031	+	AC_000046403.03.2008
4	ACATCTGCCTCTAGACTATAAATCTTTGGGCCATAGTCTCTCTTGTCTT	rs12526453	C	6	14155621	+	AC_000046403.03.2008
5	TCATACTAACCAATATGATCAACAGTTTCAAAGACGACGCTCCGACAGCTAAG	rs1333049	C	9	22063960	+	AC_00005270.03.2008
6	GAAGGTAAGGGTGGTAGGATGAGCGAGTCAAGCCAGAAACCTCTAGTTAG	rs1746048	C	10	44779824	+	AC_000046403.03.2008
7	GGCAAGTACCTGGCCACAGGGCTGCTTCATGGCCCTGGACCTGGACAGTGGAA	rs9829501	T	21	36589128	+	AC_000046403.03.2008
8	TTCAGACACTTGTCTCAGAACCCAAATGTGTTATACAGGTTAGAGGAGAA	rs10455872	G	6	161010118	+	
9	CTGACCTCAGGTGATCTGCCCTCAGCCCTCCACAGTCTTGTGATTATAG	rs17216473*	A	13	31303865	+	
10	TGTCCAAAGCCTCTCTTTGCAATTTCAATTAACCTCAATGTTGCAACCATAGA	rs10507391*	A	13	31312096	+	
11	CTCATGAACATGACTGTGAACAGAAACAGGGAGAGAAATGAAGCTGGCCAA	rs9315051	A	13	31336177	+	
12	GAGTTTTCTGGGATGTGGCTCTTCGGTTTTTAAAAATATTTTTATTGA	rs17222842*	G	13	31340117	+	
13	ACAGTTTTTACTGTAACCTGCCAATAAATAACTACTCATCTTAAAAAGACATC	rs6922269	A	8	151252985	+	NC_000006403.03.2008
14	CACACTGTCTTGGCGTCAATGAACTGGCAACTAAGCTGAGTGGAGACAC	rs17228212	C	15	67458639	+	
15	GCATGCTCTGCACCCGTGCAGAGCGCGTGTGATAATGCAITTCATGCTTGT	rs4769074	G	13	31328441	+	
16	ATACAGTCCCATCTGAGAACTGAGAGTAAAGATCAACATATGAATTTTG	rs9315050*	A	13	31338045	+	
17	ACCTACCAACCGAGGGAAATGCTAGATGAGATCCTTCCCGCGAATTTTC	rs9551963	A	13	31332547	+	
18	GCTAGTCTCTTCCCGAGCACTGTTACCGAGTGGGTTACATATATCATGG	rs17222814	G	13	31299553	+	
19	GGCTCCAAGAACAGCCTAGACACTTCTATCTGAACTGAGATTCGAGGT	rs3794020	C	6	160961137	+	
20	ACCAGATCTCGAGTTGTCATCCCGCTTCAAGCAAGGGCATGATCCCTCCAC	CD005	T	15	100230605	+	
21	AGCAAGACTGAAGTCAAGGCTAGTGGTAACTACTTTTTCTGAAACTTAGTG	rs17114036	A	1	56962621	+	
22	AGTCTCTGCTTTAAGAACCTTGAGCAGCTGAACCGGGATGGAAACCCCT	rs17609940	G	6	35034800	+	
23	TCTCCAAAGGGCTGAGAACTGGTGACTTCATCCACCTGTATTTGCACAT	rs12190287	C	6	134214625	+	
24	TGGGGCTAGCAGCTCTGGCTCAGAGCGGTCAACAGCACTGGAAGTCCCA	rs11556924	C	7	129663406	+	
25	TTTGCAGCGTGGCCCTTTCACGGGAAGCTGGGAATCTAAATGTAGCCTGAG	rs4773144	G	13	110960712	+	
26	GGGGCTAGGACTACACTCCAGCCAGCTACTCTGCTGCTGGGAGGTTG	rs2885811	C	14	100133942	+	
27	GGCCTCAGTGTACCCAGAGCTGGAGTCTCGACGGAGCGTTGGAGCAGCG	rs3825807	A	15	79089111	-	
28	TGCTGTTCAACATTTGGCTCTGAGGGAAGGATCAGTGGTTGAAAGGGGA	rs216172	C	17	2126504	-	
29	CCTAGGCTCACAGCACCAACACAGATGAATGCACCAAGATGAATGAAT	rs12936587	G	17	17543722	+	
30	TTGTACTCCAGCTCTTCCCGCATCCGTTACTCTTGACATTAACATGCT	rs48522	T	17	48988957	+	
31	TCTCCAAACATGAAAATAAACAGTAGAACACGAAAATAATTTCTTAAA	rs974819	T	11	103680567	+	
32	TTATGGTACCTAAGTATTAGCAGCAGCGCAATAGAGATAGTATTGGACC	rs4380028	C	15	79111083	-	
33	ATCTGTGCTGGTCCCGAGTGCAGCACCAAGGCAACACAGTGTAGGAAGG	rs10953541	C	7	107244545	+	
34		rs25050983	C	10	30336122	+	

Tabla G. Descripción de las características fenotípicas de los individuos incluidos en el análisis de las cohortes de estudio del corazón de REGICOR y de Framingham

	REGICOR				Framingham			
	Todos		Framingham		Todos		Framingham	
	Ninguno	CHD	CVD	p- CHD	Ninguno	CHD	CVD	p- CHD
N	2.760	2.634	89	126	3.537	2.863	674	
Edad (años)*	53.9 (11.1)	53.6 (11.0)	61.5 (9.9)	61.2 (9.9)	56.0 (9.3)	54.8 (9.2)	61.2 (7.4)	<0.001
Sexo (masculino)†	1.327 (48.1)	1.249 (47.4)	56 (62.9)	78 (61.9)	1.540 (43.5)	1.190 (41.6)	350 (51.9)	<0.001
SBP (mmHg)*	133 (20.8)	132 (20.5)	147 (18.8)	146 (21.2)	127 (18.3)	125 (17.9)	134 (18.0)	<0.001
DBP (mmHg)*	79.5 (10.3)	79.4 (10.3)	82.9 (10.4)	82.2 (11.6)	75.0 (9.8)	74.6 (9.8)	76.6 (9.7)	<0.001
Hipertensión‡	1.107 (40.2)	1.022 (38.9)	63 (70.8)	85 (68.0)	1.121 (31.7)	802 (28.0)	319 (47.5)	<0.001
Tabaquismo‡	616 (22.6)	585 (22.5)	24 (27.0)	31 (24.6)	713 (20.2)	531 (18.5)	182 (27.0)	<0.001
Colesterol total (mg/dl)*	226 (42.7)	225 (42.2)	239 (46.1)	240 (51.3)	210 (38.6)	207 (37.4)	226 (39.3)	<0.001
Colesterol-LDL (mg/dl)*	153 (38.7)	152 (38.3)	163 (39.8)	165 (44.5)	126 (34.0)	124 (33.3)	135 (37.3)	<0.001
Colesterol-HDL (mg/dl)*	52 (13.3)	52 (13.3)	44 (12.0)	46 (12.2)	51 (15.2)	52 (15.3)	47 (14.1)	<0.001
Triglicéridos (mg/dl)‡	93 (71-130)	92 (70-128)	126 (94-174)	119 (84-170)	116 (83-172)	112 (80-164)	157 (107-217)	<0.001
Tratamiento de colesterol†	184 (6.7)	166 (6.3)	13 (14.7)	18 (14.4)	166 (4.7)	118 (4.1)	48 (7.1)	0.055
Diabetes†	384 (14.2)	351 (13.6)	28 (31.8)	33 (26.6)	226 (6.4)	138 (4.8)	88 (13.1)	<0.001
Tratamiento de diabetes†	186 (9.8)	169 (9.2)	16 (35.6)	17 (27.4)	90 (2.5)	48 (1.7)	42 (6.2)	<0.001
Índice de masa corporal (kg/m²)*	27.5 (4.5)	27.4 (4.5)	29.4 (4.9)	29.4 (4.6)	27.1 (4.8)	27.0 (4.8)	27.8 (4.5)	<0.001
Obesidad (IMC ≥30 kg/m²)†	714 (26.1)	664 (25.4)	34 (38.2)	50 (40.0)	780 (22.1)	604 (21.2)	176 (26.2)	0.005
Antecedentes familiares de CHD	324 (11.8)	301 (11.5)	17 (19.3)	23 (18.4)	551 (24.8%)	478 (24.3%)	73 (29.2%)	0.016

CHD: individuos que presentaron un acontecimiento coronario durante el seguimiento; CVD: individuos que

presentaron un acontecimiento cardiovascular (incluye a aquellos con un acontecimiento coronario); SBP: tensión

arterial sistólica; DBP: tensión arterial diastólica; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta

densidad; IMC: índice de masa corporal; IC: intervalo de confianza.

* media (desviación estándar); † n (proporción, %); ‡ mediana (percentiles 25 y 75); § media (intervalo de confianza del 95%).

Figura 3

Tabla G. Descripción de las características fenotípicas de los individuos incluidos en el análisis de las cohortes de estudio del corazón de REGICOR y de Framingham

	REGICOR						Framingham					
	Todos		CVD		P		Todos		CVD		P	
	Ninguno	CHD	CHD	CVD	P	P	Ninguno	CHD	CVD	P	P	
N	2,760	2,634	89	126			2,863	429	674			
Edad (años)*	53.9 (11.1)	53.6 (11.0)	61.5 (9.9)	61.2 (9.9)	<0.001	<0.001	54.8 (9.2)	60.5 (7.8)	61.2 (7.4)	<0.001	<0.001	
Género (masculino)†	1,327 (48.1)	1,249 (47.4)	56 (62.9)	78 (61.9)	0.004	0.001	1,190 (41.6)	250 (58.3)	350 (51.9)	<0.001	<0.001	
SBP (mmHg)*	133 (20.8)	132 (20.5)	147 (18.8)	146 (21.2)	<0.001	<0.001	125 (17.9)	134 (17.4)	134 (18.0)	<0.001	<0.001	
DBP (mmHg)*	79.5 (10.3)	79.4 (10.3)	82.9 (10.4)	82.2 (11.6)	0.002	0.004	74.6 (9.8)	77.7 (9.6)	76.6 (9.7)	<0.001	<0.001	
Hipertensión‡	1,107 (40.2)	1,022 (38.9)	63 (70.8)	85 (68.0)	<0.001	<0.001	802 (28.0)	214 (50.0)	319 (47.5)	<0.001	<0.001	
Tabaquismo‡	616 (22.6)	585 (22.5)	24 (27.0)	31 (24.6)	0.320	0.578	531 (18.5)	111 (25.9)	182 (27.0)	0.002	<0.001	
Colesterol total (mg/dl)*	226 (42.7)	225 (42.2)	239 (46.1)	240 (51.2)	0.003	<0.001	207 (37.4)	224 (41.0)	226 (39.3)	<0.001	<0.001	
Colesterol-LDL (mg/dl)*	153 (38.7)	152 (38.3)	163 (39.8)	165 (44.5)	0.015	0.001	124 (33.3)	133 (35.7)	135 (37.3)	0.001	<0.001	
Colesterol-HDL (mg/dl)*	52 (13.3)	52 (13.3)	44 (12.0)	46 (12.2)	<0.001	<0.001	52 (15.2)	46 (13.1)	47 (14.1)	<0.001	<0.001	
Triglicéridos (mg/dl)‡	93 (71-130)	92 (70-128)	126 (94-174)	119 (84-170)	<0.001	<0.001	112 (80-164)	158 (104-217)	157 (107-217)	<0.001	<0.001	
Tratamiento de colesterol‡	184 (6.7)	166 (6.3)	13 (14.7)	18 (14.4)	0.002	<0.001	166 (4.7)	28 (6.5)	48 (7.1)	0.055	0.001	
Diabetes‡	384 (14.2)	351 (13.6)	28 (31.8)	33 (26.6)	<0.001	<0.001	226 (6.4)	138 (4.8)	88 (13.1)	<0.001	<0.001	
Tratamiento de diabetes‡	186 (9.8)	169 (9.2)	16 (35.6)	17 (27.4)	<0.001	<0.001	90 (2.5)	48 (1.7)	42 (6.2)	<0.001	<0.001	
Índice de masa corporal (kg/m²)*	27.5 (4.5)	27.4 (4.5)	29.4 (4.9)	29.4 (4.6)	<0.001	<0.001	27.1 (4.8)	27.0 (4.8)	27.8 (4.5)	<0.001	<0.001	
Obesidad (IMC ≥30 kg/m²)‡	714 (26.1)	664 (25.4)	34 (38.2)	50 (40.0)	0.007	<0.001	604 (21.2)	117 (27.3)	176 (26.2)	0.006	0.005	
Antecedentes familiares de CHD‡	324 (11.8)	301 (11.5)	17 (19.3)	23 (18.4)	0.026	0.020	478 (24.3%)	55 (32.5%)	73 (29.2%)	0.016	0.089	

CHD: individuos que presentaron un acontecimiento coronario durante el seguimiento; CVD: individuos que presentaron un acontecimiento cardiovascular (incluye a aquellos con un acontecimiento coronario); SBP: tensión arterial sistólica; DBP: tensión arterial diastólica; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; IMC: índice de masa corporal; IC: intervalo de confianza.

* media (desviación estándar); † n (proporción, %); ‡ mediana (percentiles 25 y 75); § media (intervalo de confianza del 95%).