

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 633**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2009** **E 09162329 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016** **EP 2264183**

54 Título: **Marcadores de riesgo para enfermedad cardiovascular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.07.2017**

73 Titular/es:

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

**Joan XXIII, 10**

**08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona), ES**

72 Inventor/es:

**SALAS PÉREZ-RASILLA, EDUARDO;**

**MARRUGAT DE LA IGLESIA, JAUME;**

**ELOSUA LLANOS, ROBERTO;**

**CASTILLO FERNÁNDEZ, SERGIO;**

**SALGADO GÓMEZ, JOAN y**

**ORDOVÁS MUÑOZ, JOSÉ MARÍA**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 623 633 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 de riesgo para 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 procedimientos para determinar si un sujeto, particularmente un sujeto humano, está en riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular, tener una enfermedad cardiovascular o experimentar una complicación de una enfermedad cardiovascular. La presente invención también se refiere al uso de tales marcadores y procedimientos para monitorizar el estado de riesgo y/o enfermedad cardiovascular en un sujeto o los efectos de medidas/agentes preventivos y/o terapéuticos en sujetos con riesgo cardiovascular o enfermedad cardiovascular.

15 **Antecedentes técnicos**

Enfermedad cardiovascular (CVD) es un término para enfermedades del corazón y los vasos sanguíneos, incluyendo, entre otros, cardiopatía isquémica (que es el tipo de CVD más frecuente en los países industrializados; este trastorno se refiere a problemas con la circulación de la sangre al miocardio), enfermedad cerebrovascular (se refiere a un problema 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) que incluyen, pero no se limitan a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de aorta y fallecimiento.

El estudio Framingham Heart Study (Kamel WB *et al.* Am J Cardiol 1988; 62:1109-1112., Wilson PWF *et al.*, Circulation 1988; 97:1837-1847, Grundy S.M. *et al.* Circulation 1988; 97:1876-1887) fue un estudio pionero en el desarrollo del concepto de factores de riesgo, que actualmente se usa y está aceptado ampliamente. Se ha reconocido que varios factores de riesgo independientes son la causa directa de enfermedad coronaria y son factores frecuentes en la población, y su modificación reduce el riesgo de acontecimientos coronarios (es decir, cardiovasculares) (Grundy S.C. *et al.*, Circulation 2000; 101:e3-e11). Los principales factores de riesgo modificables son fumar, alta tensión arterial, hipercolesterolemia (en particular alto colesterol LDL) y diabetes mellitus (Circulation 2000; 101:e3-e11).

La adaptación de todas las acciones según el riesgo absoluto (la probabilidad de que una persona desarrolle una enfermedad coronaria en un determinado periodo de tiempo) es importante, porque permite alcanzar un equilibrio adecuado entre eficacia, seguridad y costes de terapia. La estimación del riesgo absoluto requiere sumar la contribución de cada factor de riesgo y el resultado es "la determinación del riesgo global". El estudio Framingham Heart Study, tal como se mencionó anteriormente, realizó una estimación cuantitativa del riesgo global basándose en la contribución de cada factor de riesgo que ha servido para que otras sociedades desarrollen otros algoritmos para otras poblaciones. La incidencia y aparición de enfermedad cardiovascular en Europa difiere significativamente de los Estados Unidos, y se ha notificado que la escala de Framingham sobreestima el riesgo cardiovascular en la población europea (Moreno J *et al.*, Rev Med Univ Navarra 2005; 49:109-115).

Por este motivo, se han desarrollado dos escalas para estimar el riesgo cardiovascular en Europa: la escala PROCAM que estima el riesgo de complicaciones cardiovasculares (Assman G *et al.*, Circulation 2002; 105:310-315) y el proyecto SCORE (Conroy R.M. *et al.*, Eur Heart J 2003; 24:987-1003), que estima el riesgo de fallecimiento cardiovascular.

Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados para estimar el riesgo y a pesar de la recomendación de estimar el riesgo cardiovascular global en todos los pacientes, se produce un número considerable de acontecimientos cardiovasculares en pacientes asintomáticos con un riesgo intermedio según las herramientas de valoración de riesgos (Circulation 2001; 104:1863-1867).

Los pacientes con un riesgo intermedio se beneficiarían significativamente del uso de más pruebas que permitan una estratificación más precisa de su riesgo (Circulation 2001; 104:1863-1867, Am J Cardiol 2006; 97 [supl.]: 28A-32A).

Varios estudios han identificado marcadores genéticos que se asocian con el riesgo de padecer una CVD. En particular, se han publicado tres estudios que analizan si la incorporación de información genética en las funciones clásicas de riesgo mejora sus capacidades predictivas y discriminatorias. El primero, publicado por Morrison *et al.*, (Am J Epidemiol. 1 de julio de 2007; 166(1):28-35) con un seguimiento de más de 15.000 participantes del estudio ARIC, construyó en esta cohorte una escala de riesgo genético que incluía 11 polimorfismos. Sin embargo, esta función no mejora la capacidad de discriminación de los factores de riesgo clásicos (el área bajo la curva ROC solo aumentaba ligeramente desde 0,764 hasta 0,766).

El segundo, publicado por Kathiresan *et al.* (N Engl J Med. 20 de marzo de 2008; 358(12):1240-9) también usó una función de riesgo genético que incluía 9 polimorfismos relacionados con el metabolismo de los lípidos, también basándose en el número de alelos de riesgo en cada sujeto. Esta función de riesgo genético se relacionó independientemente con la aparición de acontecimientos cardiovasculares en la cohorte de Malmö. Aunque esta puntuación no mejoraba la capacidad de discriminación de los factores de riesgo clásicos (área bajo la curva ROC de 0,8 con y sin la información genética), se mejoró la reclasificación.

El tercer artículo, y el más reciente, era un estudio realizado en una cohorte de enfermeros americanos. La incorporación de la variabilidad genética en el cromosoma 9p21.3 no mejora la capacidad de discriminación (área bajo la curva ROC de desde 0,807 hasta 0,809) ni la reclasificación de individuos con respecto a la obtenida con los factores de riesgo clásicos (Ann Intern Med. 20 de enero de 2009; 150(2):65-72).

Por tanto, a pesar de varios intentos realizados para mejorar el poder de predicción de los CVRF, aún no se ha logrado este objetivo.

A partir de los siguientes documentos:

SCHUNKERT HERIBERT *ET AL.*, CIRCULATION 1 APR 2008, vol. 117, n.º 13, 1 de abril de 2008 (01-04-2008), páginas 1675-1684;

KARVANEN JUHA *ET AL.*, GENETIC EPIDEMIOLOGY APR 2009, vol. 33, n.º 3, abril de 2009 (04-2009), páginas 237-246;

SAMANI NILESH J *ET AL.*, THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 2 AUG 2007, vol. 357, n.º 5, 2 de agosto de 2007 (02-08-2007), páginas 443-453; y

YE SHU *ET AL.*, JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY 29 JUL 2008, vol. 52, n.º 5, 29 de julio de 2008 (29-07-2008), páginas 378-384;

se conoció una asociación entre el SNP específico rs1333049 y el riesgo o diagnóstico de enfermedad cardiovascular o respuesta a terapia. El documento WO 2008/102380 y WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM: "Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls". NATURE 7 JUN 2007, vol. 447, n.º 7145, 7 de junio de 2007 (07-06-2007), páginas 661-678 comprenden una divulgación similar. Sin embargo, estos documentos no se refieren a una propuesta de combinaciones ventajosas particulares de SNP.

Por consiguiente, 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 riesgo mayor de desarrollar factores de riesgo cardiovascular clásicos de manera que puedan implementarse medidas preventivas para mantener el riesgo cardiovascular al nivel más bajo posible.

### Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de determinar si un sujeto tiene un riesgo aumentado de tener una enfermedad o trastorno cardiovascular o de determinar la respuesta a una terapia cardiovascular tal como se define en la reivindicación 1.

La invención proporciona además un procedimiento para identificar un sujeto que necesita terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o que necesita terapia cardiovascular profiláctica que comprende las etapas de determinar en una muestra aislada de dicho sujeto la presencia de polimorfismos en las posiciones 27 dentro de secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 es indicativa de tener una respuesta disminuida a una terapia cardiovascular o de necesitar terapia cardiovascular temprana y agresiva o necesitar tratamiento cardiovascular profiláctico.

En un aspecto de referencia, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad cardiovascular con una terapia cardiovascular en el que el paciente se selecciona para dicha terapia basándose en la presencia, en una muestra aislada de dicho sujeto, de un polimorfismo en la posición 27 en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que dicho polimorfismo en dicha posición 27 es C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a procedimientos para la determinación de la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina mortal o no mortal en un periodo de 10 años tal como se define en las reivindicaciones 7, 8 ó 9.

En aún un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad de los nucleótidos en la posición 27 dentro de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11.

**5 Descripción detallada de la invención**

Los autores de la presente invención han identificado una serie de marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que, cuando se usan en combinación, están asociados con un riesgo de CVD y/o con un riesgo de complicaciones de CVD que incluyen, pero no se limitan a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de aorta y fallecimiento. Estos marcadores polimórficos parecen mostrar valor predictivo independientemente de los factores de riesgo clásicos tales como altos niveles de LDL y VLDL, hábitos de fumar, bajos niveles de HDL, altos niveles de lipoproteína A, hipertensión, diabetes, altos niveles de homocisteína, altos niveles de factores hemostáticos, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, historia familiar y similares y son superiores a los polimorfismos usados individualmente o a los factores de riesgo cardiovascular convencionales.

Procedimiento para determinar si un sujeto tiene un riesgo alterado de tener una enfermedad cardiovascular adversa

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento (a continuación en el presente documento el primer procedimiento de la invención) de determinar si un sujeto tiene un riesgo aumentado de tener una enfermedad o trastorno cardiovascular o de determinar la respuesta a una terapia cardiovascular en un sujeto que comprende las etapas de determinar, en una muestra aislada de dicho sujeto, la identidad de los nucleótidos en la posición 27 dentro de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11 (véase la tabla 1), en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 es indicativa de un riesgo aumentado de tener enfermedad o trastorno cardiovascular o de una baja respuesta a una terapia cardiovascular.

Los términos “polimorfismo” y “polimorfismo de un solo nucleótido” (SNP) se usan en el presente documento de manera intercambiable y se refieren a una variación de 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 baja frecuencia de alelo mayor que aproximadamente el 1% en una población definida. Los polimorfismos de un solo nucleótido según la presente solicitud pueden encontrarse dentro de secuencias codificantes de genes, regiones no codificantes de genes o las regiones intrónicas entre genes.

La lista de polimorfismos que se usan en el procedimiento de la presente invención se facilita en la tabla 1.

SEQ ID NO:	Secuencia que comprende el polimorfismo	número de registro en dbSNP	Alelo de riesgo	Crom.	Posición en crom.	Cadena	Número de registro / versión
1	TCATACTAACCATATGATCAACAGTT CAAAGCAGCCACTCGCAGAGGTAAG	rs1333049	C	9	22063860	+	AC_000052 / 03.03.2008
2	AAAGAGAAAAGAAATAGGAGCAGGAT CAACTTCCAGATATACAGAGAATATAA	rs599839	A	1	109623689	+	NC_000001 / 03.03.2008
3	AACCATAATAGTTATGCTGAGAAGT TCTTTTTTGTCTATAGTCAAGATAACA	rs17465637	C	1	196042601	+	AC_000044 / 03.03.2008
4	TTGAAAAAATTAATTCTCACACT CCTAAGTGCATTTAATTTAAGCTACTTT	rs501120	T	10	40757334	+	AC_000053 / 03.03.2008
5	AAAAGCAAGCACATCTGTGGCATT ACCAACATTAATATTTATATACATAGT	rs2943634	C	2	220837297	+	AC_000045 / 03.03.2008
6	ACAGTTTTTACTGTAAGTCCCAAT AAATAACTCATCTTAAAAAGACATC	rs6922269	A	6	151294678	+	NC_000006 / 03.03.2008
7	GGCAAGTACCTGGGCACAGGGCTGC TTCATGGCCTTGGACCTGGACAGTGG	rs9982601	T	21	20798690	+	AC_000064 / 03.03.2008
8	ACATCTGCCTCTCTAGACTATAAAC TCTTTGGGGCTAGGTCTTCTTTGTCTT	rs12526453	C	6	14155621	+	AC_000049 / 03.03.2008
9	GCTATCATTTAAATTTGGTTGAGAC ACAATATGCTGTTGCACTTTCTATAAA	rs6725887	C	2	197498571	+	AC_000045 / 03.03.2008
10	CTGTGCTGCTTGGTGCCTCTCTGAT ATGAATACACTGACACGTCAAAGTAAC	rs9818870	T	3	136547031	+	AC_000046 / 03.03.2008
11	CTTGCTCCAGCATCCAGGAGGTCCG GTGGTGCACACGGCTTGAGATGCCTGA	rs3184504	T	12	111511042	+	AC_000055 / 03.03.2008

Tabla 1: Polimorfismos usados en el procedimiento de la invención incluyendo SEQ ID NO:, las secuencias que

flanquean el polimorfismo y la posición polimórfica (subrayada), el número de registro en dbSNP, el cromosoma y la posición en el cromosoma en la que se encuentra el polimorfo y el número de registro y versión de la base de datos de la secuencia del fragmento cromosómico.

5 El término “determinar si un sujeto tiene un riesgo alterado”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto padecerá una enfermedad. El término “determinar la respuesta a una terapia cardiovascular”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la valoración de la probabilidad con la que un sujeto responderá a una terapia. Como entenderán los expertos en la técnica, una valoración de este tipo, aunque se prefiere que sea correcta, habitualmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que van a diagnosticarse o evaluarse. Sin embargo, el término requiere que una porción estadísticamente significativa de sujetos pueda identificarse como que tienen un riesgo aumentado o que responden a la terapia. Si una porción es estadísticamente significativa puede determinarse sin mayores problemas por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, de 0,2, 0,1 ó 0,05.

20 El término “enfermedad o trastorno cardiovascular”, tal como se usa en el presente documento, incluye enfermedades que afectan al corazón o a los vasos sanguíneos o a ambos o asociadas con los aparatos cardiopulmonar y circulatorio incluyendo, pero sin limitarse a, isquemia, angina, estados edematosos, arterosclerosis, cardiopatía coronaria, oxidación de LDL, adhesión de monocitos a células endoteliales, formación de macrófagos espumosos, desarrollo de estría grasa, adherencia plaquetaria y agregación, proliferación de células del músculo liso, lesión por reperfusión, alta tensión arterial, enfermedad trombótica, arritmia (auricular o ventricular o ambas); trastornos 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, 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, insuficiencia limitada a un solo órgano o tejido.

35 En un modo de realización preferido, la enfermedad cardiovascular cuyo riesgo va a detectarse se selecciona del grupo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de aorta o una combinación de los mismos.

40 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 anteriormente mencionadas. Las terapias adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, agentes trombolíticos, antitrombóticos, agentes antiarrítmicos, agentes que prolongan la repolarización, agentes antihipertensores, vasodilatador, antihipertensores, diuréticos, agentes inotrópicos, agentes antianginosos y similares.

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

50 Los ejemplos no limitativos de antiagregantes plaquetarios incluyen aspirina, un dextrano, dipiridamol (persantina), heparina, sulfipiranona (Anturane), clopidrogel y ticlopidina (Ticlid). Los ejemplos no limitativos de agentes trombolíticos incluyen activador del plasminógeno tisular (Activase), plasmina, pro-uroquinasa, uroquinasa (Abbokinase), estreptoquinasa (Streptase), anistreplasa/APSAC (Eminase).

55 En determinados modos de realización en las que un paciente padece de una hemorragia o una probabilidad aumentada de padecer una hemorragia, puede usarse un agente que pueda aumentar la coagulación sanguínea. Los ejemplos no limitativos de agentes que promueven la coagulación sanguínea incluyen antagonistas de agente trombolítico y antagonistas de anticoagulante. Los ejemplos no limitativos de antagonistas de anticoagulante incluyen protamina y vitamina K1.

60 Los ejemplos no limitativos de antagonistas de agente trombolítico incluyen ácido aminocaproico (Amicar) y ácido tranexámico (Amstat). Los ejemplos no limitativos de antitrombóticos incluyen anagrelida, argatroban, cilstatol, daltroban, defibrotida, enoxaparina, fraxiparina, indobufeno, lamoparano, ozagrel, picotamida, plafibrida, tedelparina, ticlopidina y triflusal.

65 Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos incluyen agentes antiarrítmicos de clase I (bloqueantes de 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 canales de

calcio) y agentes antiarrítmicos diversos.

5 Los ejemplos no limitativos de bloqueantes de 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 (Pronestyl) 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 (Tambacor).

10 Los ejemplos no limitativos de beta-bloqueantes, también conocidos como bloqueante beta-adrenérgico, 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, moprolool, nadolol, nadoxolol, nifenalol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propanolol (Inderal), sotalol (Betapace), sulfinalol, talinolol, tertatolol, timolol, toliprolol y xibinolol. En determinados modos de realización, 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, moprolool, nadolol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propanolol, talinolol, tertatolol, timolol y toliprolol.

25 Los ejemplos no limitativos de agentes con capacidades hipolipemiantes incluyen, sin limitación, secuestrantes de ácido biliar 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; gemfibrozilo y otros ácidos fibricos, tales como clofibrato, fenofibrato, benzafibrato y cipofibrato; probucol; raloxifeno y sus derivados.

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

35 Los ejemplos no limitativos de bloqueante de canales de calcio, también conocidos como agente antiarrítmico de clase IV, incluyen una arilalquilamina (por ejemplo, bepridilo, diltiazem, fendilina, galopamilol, prenilamina, terodilina, verapamilol), un derivado de dihidropiridina (felodipina, isradipina, nifedipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina), un derivado de piperazina (por ejemplo, cinarizina, flunarizina, lidoflazina) o un bloqueante de canales de calcio diverso tal como benciclano, etafenona, magnesio, mibefradil o perhexilina. En determinados modos de realización, un bloqueante de canales de calcio comprende un antagonista de calcio de dihidropiridina de acción prolongada (tipo nifedipino).

40 Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos diversos incluyen adenosina (Adenocard), digoxina (Lanoxin), acecainida, ajmalina, amoproxano, 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.

45 Los ejemplos no limitativos de agentes antihipertensores incluyen agentes simpatolíticos, alfa/beta-bloqueantes, alfa-bloqueantes, agentes antiangiotensina II, beta-bloqueantes, bloqueantes de canales de calcio, vasodilatadores y antihipertensores diversos.

50 Los ejemplos no limitativos de alfa-bloqueante, también conocido como bloqueante alfa-adrenérgico o un antagonista alfa-adrenérgico, incluyen amosulalol, arotinolol, dapiprazol, doxazosina, mesilatos ergoloides, fenspirida, indoramina, labetalol, nicergolina, prazosina, terazosina, tolazolol, trimazosina y yohimbina. En determinados modos de realización, un alfa-bloqueante puede comprender un derivado de quinazolina. Los ejemplos no limitativos de derivados de quinazolina incluyen alfuzosina, bunazosina, doxazosina, prazosina, terazosina y trimazosina. En determinados modos de realización, un agente antihipertensor es un antagonista tanto alfa como beta-adrenérgico. Los ejemplos no limitativos de un alfa/beta-bloqueante comprenden labetalol (Normodyne, Trandate).

60 Los ejemplos no limitativos de agentes antiangiotensina 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 ACE) incluyen alacepril, enalapril (Vasotec), captopril, cilazapril, delapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril y ramipril. Los ejemplos no limitativos de bloqueante del receptor de angiotensina II, también conocido como antagonista del receptor de angiotensina II, bloqueantes de receptor de ANG o bloqueantes de receptor tipo 1 de ANG-II (ARBS), incluyen angiocandesartán, eprosartán, irbesartán, losartán y valsartán. Los ejemplos no limitativos de agentes simpatolíticos incluyen agentes simpatolíticos que actúan en el sistema nervioso central o agentes simpatolíticos que actúan en el sistema nervioso periférico. Los ejemplos no limitativos de agentes simpatolíticos que actúan en el sistema nervioso central,

también conocidos como agentes simpatolíticos del sistema nervioso central (SNC), incluyen clonidina (Catapres), guanabenz (Wytensin), guanfacina (Tenex) y metildopa (Aldomet). Los ejemplos no limitativos de un simpato lítico de acción periférica incluyen agentes bloqueantes de ganglios, un agente bloqueante neuronales adrenérgicos, un agente bloqueante beta-adrenérgico o un agente bloqueante a-adrenérgico. Los ejemplos no limitativos de agentes bloqueantes de ganglios incluyen mecamilamina (Inversine) y trimetapan (Arfonad). Los ejemplos no limitativos de agentes bloqueantes neuronales adrenérgicos incluyen guanetidina (Ismelin) y reserpina (Serpasil). Los ejemplos no limitativos de bloqueantes beta-adrenérgicos incluyen acenitolo (Sectral), atenolol (Tenormin), betaxolol (Kerlone), carteolol (Cartrol), labetalol (Normodyne, Trandate), metoprolol (Lopressor), nadanol (Corgard), penbutolol (Levitol), pindolol (Visken), propranolol (Inderal) y timolol (Blocadren). Los ejemplos no limitativos de bloqueantes alfa-adrenérgicos incluyen prazosina (Minipress), doxazocina (Cardura) y terazosina (Hytrin).

En determinados modos de realización un agente terapéutico cardiovascular puede comprender un vasodilatador (por ejemplo, un vasodilatador cerebral, un vasodilatador coronario o un vasodilatador periférico). En determinados modos de realización preferidos, un vasodilatador comprende un vasodilatador coronario. Los ejemplos no limitativos de vasodilatadores coronarios incluyen amotrífeno, bendazol, hemisuccinato de benfurodilo, benziodarona, cloracizina, cromonar, clobenfurol, clonitrato, dilazep, dipiridamol, droprenilamina, efloxato, tetranitrano de eritritilo, etafenona, fendilina, floredil, ganglefeno, herestrol bis(beta-dietilaminoetil éter), hexobendina, tosilo de itramina, kelina, lidoflanina, hexanitrate de manitol, medibazina, nicorglicerina, tetranitrato de pentaeritritol, pentritinol, perhexilina, pimefilina, trapidil, tricromilo, trimetazidina, fosfato de trinitrato y visnadina.

En determinados modos de realización, un vasodilatador puede comprender un vasodilatador de terapia crónica o un vasodilatador de emergencia hipertensor. Los ejemplos no limitativos de un vasodilatador de terapia crónica incluyen hidralazina (Apresoline) y minoxidil (Loniten). Los ejemplos no limitativos de un vasodilatador de emergencia hipertensor incluyen nitroprusiato (Nipride), diazóxido (Hyperstat 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, tiosemicarbazona de metil 4-piridil cetona, muzolimina, pargilina, pempidina, pinacidilo, piperoxano, primaperona, una protoveratrina, raubasina, rescimetol, rilmenideno, saralazina, nitroprusiato de sodio, ticrinafeno, camsilato de trimetapan, tirosinasa y urapidil.

En determinados modos de realización, 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, una hidrazina/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, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, ciclotiazida, diazóxido, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotizida, hidrofumetizida, metoclotiazida, metocrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclormetiazida y triclorometiazida. Los ejemplos no limitativos de derivados de N-carboxialquil(péptido/lactama) incluyen alacepril, captopril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril y ramipril. Los ejemplos no limitativos de derivados de dihidropiridina incluyen amlodipina, felodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nisoldipina y nitrendipina. 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 tonidina. 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 sirosingopina. Los ejemplos no limitativos de derivados de sulfonamida incluyen ambulida, clopamida, furosemida, indapamida, quinetazona, tripamida y xipamida. Los vasopresores generalmente se usan para aumentar la tensión arterial durante el choque, que puede producirse durante un procedimiento quirúrgico. Los ejemplos no limitativos de un vasopresor, también conocido como antihipotensor, incluyen metilsulfato de amezinio, amida angiotensina, dimetofrina, dopamina, etifelmina, etilefrina, gepefrina, metaraminol, midodrina, norepinefrina, foledrina y sinefrina. Los ejemplos no limitativos de agentes para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva incluyen agentes antiangiotensina II, tratamiento de reducción de después de la carga-antes de la carga, diuréticos y agentes inotrópicos.

En determinados modos de realización, un animal, por ejemplo un paciente humano, que no puede tolerar un antagonista de angiotensina puede tratarse con una terapia 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, bendroflumetiazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clorotiazida, clortalidona,

ciclopentiazida, epitiazida, etiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, metilclotiazida, meticrane, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclorometiazida, triclorometiazida), un organomercurio (por ejemplo, clormerodrino, meralurida, mercamfamida, mercaptomerina sódica, ácido mercumalílico, mercumetilina sódica, cloruro mercurioso, mersalilo), una pteridina (por ejemplo, furtereno, triamtereno), purinas (por ejemplo, acefilina, 7-morfolinometilteofilina, pamobrom, proteobromina, teobromina), esteroides incluyendo antagonistas de aldosterona (por ejemplo, canrenona, oleandrina, espironolactona), un derivado de sulfonamida (por ejemplo, acetazolamida, ambusida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloraminofenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, 4,4'-disulfonamida de difenilmetano, 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, clorazanilo, ácido etacrínico, etozolina, hidracarbazina, isosorbida, manitol, metocalcona, muzolimina, perexilina, ticnafén y urea.

Los ejemplos no limitativos de agentes inotrópicos positivos, también conocidos como cardiotónicos, incluyen acefilina, 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 lanatóside, metamivam, milrinona, nerifolina, oleandrina, ouabaina, oxifedrina, prenalterol, proscilaridina, resibufogenina, escilareno, escilarenina, estrofantina, sulmazol, teobromina y xamoterol.

En modos de realización particulares, un agente inotrópico es un glucósido cardíaco, un agonista beta-adrenérgico o un inhibidor de la fosfodiesterasa. Los ejemplos no limitativos de glucósidos cardíacos incluyen digoxina (Lanoxin) y digitoxina (Crystodigin). Los ejemplos no limitativos de agonistas beta-adrenérgicos incluyen albuterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clenbuterol, clorprenalina, denopamina, dioxetodrina, dobutamina (Dobutrex), dopamina (Intropin), dopexamina, efedrina, etafedrina, etinorepinefrina, 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 la fosfodiesterasa incluyen amrinona (Inocor).

Los agentes antianginosos pueden comprender organonitratos, bloqueantes de 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, Sorbitrate) y nitrato de amilo (Aspirol, Vaporole). La endotelina (ET) es un péptido de 21 aminoácidos que tiene potentes efectos fisiológicos y fisiopatológicos que parecen estar implicados en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Los efectos de ET están mediados a través de la interacción con dos clases de receptores de 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. En la técnica se conocen 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 de receptores de endotelina (ERA) incluyen bosentán, enrasentán, ambrisentán, darusentán, tezoseptán, atrasentán, avosentán, clazosentán, edonentán, sitaxentán, TBC 3711, BQ 123 y BQ 788.

El término "muestra", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra 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 líquidos corporales o extractos de los mismos.

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

Una vez que se ha obtenido una muestra biológica de un sujeto (por ejemplo, un líquido corporal, tal como orina, saliva, plasma, suero, o una muestra de tejido, tal como muestra de tejido bucal o célula bucal) normalmente se emprende la detección de una variación de secuencia o variante alélica de SNP. Se emplea prácticamente cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica. Quizás el procedimiento más directo es determinar realmente la secuencia de o bien ADN genómico o bien ADNc y comparar estas secuencias con alelos conocidos de SNP del gen. Esto puede ser un proceso bastante caro y que requiere mucho tiempo. No obstante, esta tecnología es bastante común y bien conocida.

Puede usarse cualquiera de una variedad de procedimientos que existen para detectar variaciones de secuencia en

los procedimientos de la invención. El procedimiento particular usado no es importante en la estimación de riesgo cardiovascular o selección del tratamiento.

5 Existen otros procedimientos disponibles comercialmente posibles para la identificación de SNP de alto rendimiento que no usan tecnologías de secuenciación directa. Por ejemplo, la tecnología Veracode de Illumina, la química de genotipado de SNP Taqman® y la química de genotipado de SNP KASPar.

10 Una variación en el procedimiento de determinación de secuencia directa es el procedimiento Gene Chip(TM) disponible de Affymetrix. Alternativamente, también están disponibles comercialmente modos robustos y más económicos de detectar la variación de la secuencia de ADN. Por ejemplo, Perkin Elmer adaptó su ensayo TAQman Assay(TM) para detectar la variación de secuencia. Orchid BioSciences tiene un procedimiento denominado SNP-IT (TM) (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' de una sonda de oligonucleótidos, entonces se identifica la base extendida usando fluorescencia directa, ensayo colorimétrico indirecto, espectrometría de masas o polarización de fluorescencia. Sequenom usa una tecnología de captura de hibridación más MALDI-TOF (espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo) para detectar genotipos de SNP con su sistema MassARRAY(TM). Promega proporciona el sistema de SNP/genotipado READIT(TM) (patente estadounidense n.º 6.159.693). En este procedimiento, se hibridan sondas de ADN o ARN con secuencias de ácido nucleico diana. Las sondas que son complementarias a la secuencia diana en cada base se despolimerizan con una mezcla propietaria de enzimas, mientras que las sondas que difieren de la diana en la posición de interrogación permanecen intactas. El procedimiento 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 procedimiento Invader OS(TM) que usa enzimas Cleavaseg propietarias, que reconocen y cortan únicamente la estructura específica formada durante el proceso Invader. Invader OS se basa en la amplificación lineal de la señal generada por el proceso Invader, en vez de en amplificación exponencial de la diana. El ensayo Invader OS no utiliza PCR en ninguna parte del ensayo. Además, existen varios laboratorios de pruebas de ADN forenses y muchos laboratorios de investigación que usan PCR específica para el gen, seguido por digestión con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel (u otra tecnología de separación por tamaños) para detectar polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (RFLP).

20 En diversos modos de realización de cualquiera de los aspectos anteriores, se identifica la presencia o ausencia de los SNP amplificando o no logrando amplificar un producto de amplificación a partir de la muestra. Las amplificaciones de polinucleótido son normalmente dependientes de la plantilla. Tales amplificaciones se basan generalmente en la existencia de una cadena de plantilla para realizar copias adicionales de la plantilla. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos que son capaces de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de la plantilla, que se hibrida con la cadena de la plantilla. Normalmente, los cebadores tienen una longitud de desde diez hasta treinta pares de bases, pero pueden emplearse secuencias más largas. Pueden proporcionarse cebadores en forma de cadenas sencillas y/o cadenas dobles, aunque generalmente se prefiere la forma de cadenas sencillas. A menudo, se diseñan pares de cebadores para hibridarse de manera selectiva con regiones diferenciadas de un ácido nucleico de plantilla, y se ponen en contacto con el ADN de plantilla en condiciones que permiten hibridación selectiva. Según la aplicación deseada, pueden seleccionarse condiciones de hibridación de alta rigurosidad que únicamente permitirán la hibridación con secuencias que son totalmente complementarias a los cebadores. En otros modos de realización, puede producirse hibridación con 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 de plantilla-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de la plantilla. Se llevan a cabo múltiples rondas de amplificación, también denominadas "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

#### 50 Reacción en cadena de la polimerasa

Están disponibles varios procesos dependientes de la plantilla para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una muestra de plantilla dada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa. En PCR, se usan pares de cebadores que se hibridan de manera selectiva con ácidos nucleicos en condiciones que permiten la hibridación selectiva. El término cebador, tal como se usa en el presente documento, abarca cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de la plantilla. Pueden proporcionarse cebadores en forma de cadenas sencillas o cadenas dobles, aunque se prefiere la forma de cadenas sencillas. Se usan cebadores en uno cualquiera de varios procesos dependientes de la plantilla para amplificar las secuencias de genes diana presentes en una muestra de plantilla dada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es PCR, que se describe en detalle en las patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, cada una incorporada en el presente documento como referencia. En PCR, se preparan dos secuencias de cebadores que son complementarias a regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia de gen(es) diana. Los cebadores se hibridarán para formar un complejo de ácido nucleico:cebador si la secuencia de gen(es) 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 de ácido nucleico dependiente de la plantilla. Si se ha formado el

complejo de secuencia de gen(es) diana:cebador, la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia de gen(es) diana añadiendo nucleótidos. Al elevar y bajar la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del/de los gen(es) diana para formar 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 proceso. Se llevan a cabo estas múltiples rondas de amplificación, denominadas “ciclos”, 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. En todavía otros modos de realización de cualquiera de los aspectos anteriores se identifica la presencia o ausencia del SNP hibridando la muestra de ácido nucleico con un cebador marcado con un resto detectable. En otros modos de realización de cualquiera de los aspectos anteriores el resto detectable se detecta en un ensayo enzimático, radioensayo, inmunoensayo o detectando fluorescencia. En otros modos de realización de cualquiera de los aspectos anteriores se marca el cebador con un tinte detectable (por ejemplo, SYBR Green I, YO-PRO-I, naranja de tiazol, Hex, pico green, edans, fluoresceína, FAM, o TET). En otros modos de realización de cualquiera de los aspectos anteriores los cebadores se ubican sobre un chip. En otros modos de realización de cualquiera de los aspectos anteriores los cebadores para la amplificación son específicos para dichos SNP.

Otro procedimiento para la amplificación es la reacción en cadena de la ligasa (“LCR”). LCR difiere de PCR porque amplifica la molécula de sonda en vez de producir amplicón mediante polimerización de nucleótidos. En 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 sondas se unirán para formar una sola unidad. Al realizar ciclos de temperatura, como en PCR, se disocian unidades ligadas unidas de la diana y entonces sirven como “secuencias diana” para el ligamiento de pares de sondas en exceso. La patente estadounidense n.º 4.883.750, incorporada en el presente documento como referencia, describe un procedimiento similar a LCR para unir pares de sondas a una secuencia diana.

#### Amplificación isotérmica

Un procedimiento de amplificación isotérmica, en el que se usan ligasas y endonucleasas de restricción para lograr la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótido 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 un modo de realización, se usa el procedimiento de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para tipificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

#### Amplificación con desplazamiento de la cadena

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

#### Amplificación basada en la transcripción

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basada en la transcripción, incluyendo amplificación basada en secuencias de ácido nucleico. En la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico, los ácidos nucleicos se preparan para la amplificación mediante extracción con fenol/cloroformo convencional, desnaturalización térmica de una muestra clínica, tratamiento con tampón de lisis y columnas minispín para aislamiento de ADN y ARN o extracción con cloruro de guanidinio de ARN. Estas técnicas de amplificación implican hibridar un cebador que tiene secuencias específicas para la diana. Tras la polimerización, se digieren híbridos de ADN/ARN con ARNasa H mientras que las moléculas de ADN bicatenario se vuelven a someter a desnaturalización térmica. En cualquier caso, el ADN monocatenario se vuelve totalmente bicatenario mediante la adición de un segundo cebador específico para la diana, seguido por polimerización. Entonces se transcriben de manera múltiple las moléculas de ADN bicatenario por una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN se someten a transcripción inversa para dar ADN bicatenario, y se transcriben una vez contra una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, tanto si son truncados o completos, indican secuencias específicas para la diana.

Pueden usarse otros procedimientos de amplificación según la presente invención. En un modo de realización, se usan cebadores “modificados” en una síntesis dependiente de las enzimas y la plantilla, de tipo PCR. Los cebadores pueden modificarse mediante marcaje con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto de detección (por ejemplo, enzima). En presencia de una secuencia diana, la sonda se une y se escinde de manera catalítica. Después de la escisión, la secuencia diana se libera intacta para unirse con la sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada indica la presencia de la secuencia diana. En otro enfoque, un proceso de amplificación de ácido nucleico implica sintetizar de manera cíclica ARN monocatenario (“ARNmc”), ADNmc, y ADN bicatenario (ADNbc),

que puede usarse según la presente invención. El ARN<sub>mc</sub> es una primera plantilla para un primer oligonucleótido de cebador, que se alarga mediante transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). Entonces se retira el ARN del dúplex de ADN:ARN resultante mediante la acción de ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica para ARN en el dúplex con o bien ADN o bien ARN). El ADN<sub>mc</sub> resultante es una segunda plantilla para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (mostrada a modo de ejemplo mediante ARN polimerasa T7) en 5' de su homología con la plantilla. Este cebador se extiende luego mediante ADN polimerasa (mostrada a modo de ejemplo por el fragmento de "Klenow" grande de ADN polimerasa I de *E. coli*), dando como resultado una molécula de ADN bicatenario ("ADN<sub>bc</sub>"), 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 mediante la ARN polimerasa adecuada para hacer muchas copias de ARN del ADN. Estas copias pueden entonces volver a entrar en el ciclo conduciendo a una amplificación muy rápida. Con la elección adecuada de enzimas, esta amplificación puede realizarse de manera isotérmica sin adición de enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este proceso, la secuencia de inicio puede elegirse para estar en forma de o bien ADN o bien ARN.

#### Procedimientos para la separación de ácidos nucleicos

Puede ser deseable separar productos de ácido nucleico de otros materiales, tales como plantilla y cebador en exceso. En un modo de realización, los productos de amplificación se separan mediante electroforesis en gel agarosa, agarosa-acrilamida o poliacrilamida usando procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Los productos de amplificación separados pueden cortarse y eluirse del gel para 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 efectuarse mediante técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Hay muchos tipos de cromatografía que pueden usarse en la práctica de la presente invención, incluyendo adsorción, división, intercambio iónico, hidroxilapatita, tamiz molecular, fase inversa, columna, papel, capa fina y cromatografía de gases, así como HPLC. En determinados modos de realización, se visualizan los productos de amplificación. Un procedimiento de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de bandas bajo luz UV. Alternativamente, si los productos de amplificación están marcados íntegramente con nucleótidos radiomarcados o fluorométricamente marcados, los productos de amplificación separados pueden exponerse a una película de rayos X o visualizarse con luz que presente los espectros de excitación apropiados.

Alternativamente, la presencia de las posiciones polimórficas según el procedimiento 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 no mutado. Con "hibridar" quiere decirse un par para formar una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótido complementarias, o partes de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa será normalmente menor que aproximadamente NaCl 750 mM y citrato de trisodio 75 mM, preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato de trisodio 50 mM y más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato de trisodio 25 mM. Puede obtenerse hibridación de baja rigurosidad en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse hibridación de alta rigurosidad en presencia de al menos aproximadamente el 35% de formamida y más preferiblemente al menos aproximadamente el 50% de formamida. Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán normalmente temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37°C, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C. Los expertos en la técnica conocen bien la variación de parámetros adicionales, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión del ADN portador. Se consiguen diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En un modo de realización preferido, la hibridación se producirá a 30°C en NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM y SDS al 1%. En un modo de 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 desnaturalizado 100 [mu]g/ml (ADNes). En el modo de realización más preferido, la hibridación se producirá a 42°C en NaCl 250 mM, citrato de trisodio 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50% y ADNes 200 [mu]g/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 cuanto a la rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad de lavado pueden definirse mediante la concentración de sal y mediante la temperatura. Como antes, puede aumentarse la rigurosidad de lavado disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente de menos de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato de trisodio 3 mM y lo más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato de trisodio 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán normalmente una temperatura de al menos aproximadamente 25°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C, e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68°C. En un modo de realización preferido, las etapas de lavado se producirán a 25°C en NaCl 30 mM, citrato de trisodio 3 mM y SDS al 0,1%. En un modo de realización más preferido, 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 un modo de realización más preferido, 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 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.* (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Las moléculas de ácido nucleico útiles para la hibridación en los procedimientos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que presenta identidad sustancial de modo que sea capaz de hibridarse específicamente con los ácidos nucleicos diana. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con respecto a una secuencia endógena son normalmente capaces de hibridarse con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Por "sustancialmente idéntico" quiere decirse un polipéptido o molécula de ácido nucleico que presenta al menos el 50% de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o una 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 aminoácidos o ácido nucleico con respecto a la secuencia usada para comparación. La identidad de secuencia se mide normalmente usando software de análisis de secuencias (por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Tal software hace coincidir secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente 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, indicando una puntuación de probabilidad de entre  $e^{-3}$  y  $e^{-100}$  una secuencia estrechamente relacionada.

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

Se entiende que la expresión "riesgo aumentado de tener una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso" muestra una propensión a padecer una enfermedad de este tipo más alta que el promedio en la población.

La expresión "baja respuesta a una terapia cardiovascular" quiere decir que tiene una reacción reducida a la terapia. Cuando un sujeto tiene un grado de respuesta reducido a la terapia, se requiere una cantidad o número de agentes terapéuticos aumentado para lograr un efecto terapéutico dado. Se han descrito en detalle anteriormente terapias cardiovasculares adecuadas que van a aplicarse a sujetos seleccionados según el procedimiento de la presente invención.

#### Procedimiento para identificar un sujeto que necesita terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o que necesita terapia cardiovascular profiláctica

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento (a continuación en el presente documento el segundo procedimiento de la invención) para identificar un sujeto que necesita terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o que necesita terapia cardiovascular profiláctica que comprende las etapas de determinar, en una muestra aislada de dicho sujeto, la identidad del nucleótido en la posición 27 dentro de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 es indicativa de tener una respuesta disminuida a una terapia cardiovascular o de necesitar terapia cardiovascular temprana y agresiva o de necesitar terapia cardiovascular profiláctica.

El término "terapia cardiovascular" se ha definido en detalle en el primer procedimiento de la invención.

Con "terapia cardiovascular temprana y agresiva" quiere decirse un enfoque de tratamiento que tiene el objetivo de controlar la tensión arterial rápidamente, lo que para algunos individuos requerirá el uso de múltiples fármacos antihipertensores. Si se desea, tal terapia también puede incluir control de glucosa, control de metabolismo de los lípidos, control de pérdida de peso y cese del tabaquismo.

Tal como se describió anteriormente, los procedimientos o composiciones específicos usados para detectar polimorfismos (por ejemplo, SNP, RFLP) no son significativos. La invención emplea prácticamente cualquier procedimiento para detectar una variación de alelos que se conoce en la técnica.

La clave en la determinación del riesgo y la selección del tratamiento es la identificación de un SNP alélico particular y la correlación de estos SNP de secuencia con la selección del tratamiento, el beneficio de la terapia o el riesgo de un acontecimiento cardiovascular adverso. Esta información genética es útil de manera aislada, pero puede ser

incluso más útil cuando se combina con otros factores de importancia clínica para la salud cardiovascular. Tales factores incluyen edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, tabaquismo, historia de consumo de alcohol, historia de tabaquismo, historia de ejercicio, dieta, historia familiar de enfermedad cardiovascular, nivel de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, historia de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal o hipertrofia ventricular izquierda. Por tanto, en otro aspecto, el primer y el segundo procedimiento de la invención pueden incluir además la determinación de factores de riesgo clásicos.

Los factores de riesgo clásicos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, sin limitación, edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, tabaquismo, historia de consumo de alcohol, historia de tabaquismo, historia de ejercicio, dieta, historia familiar de enfermedad cardiovascular, nivel de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, historia de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal o hipertrofia ventricular izquierda.

Los conjuntos preferidos de marcadores de riesgo clásicos incluyen los que forman parte de modelos conocidos para predecir el riesgo de CVD tal como el original de Framingham y también los derivados del mismo tal como, pero sin limitarse a, los modelos REGICOR, y SCORE, PROCAM o QRISK. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo de Framingham y en los derivados del mismo incluyen edad, colesterol total, colesterol HDL, tensión arterial, diabetes y tabaquismo. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo REGICOR incluyen edad, sexo, colesterol, colesterol HDL, tensión arterial sistólica, estado diabético y tabaquismo. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo SCORE incluyen edad, colesterol, tensión arterial sistólica y tabaquismo. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo PROCAM incluyen edad, sexo, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, tensión arterial sistólica, estado diabético, tabaquismo, historia familiar de infarto de miocardio. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo QRISK incluyen edad, razón de colesterol total/colesterol HDL, índice de masa corporal, historia familiar de CVD prematura, tabaquismo, puntuación de Townsend de la zona de resultados (*output area*), tensión arterial sistólica, tratamiento para la hipertensión e interacción de SBP\*tratamiento para la HTN.

La invención puede emplear métricas (por ejemplo, procedimientos matemáticos) para evaluar si existe una relación entre información genética y riesgo de un desenlace cardiovascular adverso. La precisión predictiva de tales procedimientos se mejora generalmente cuando se considera el efecto de uno o más de otros factores en el pronóstico cardiovascular. Puede usarse un procedimiento matemático métrico, por ejemplo, para correlacionar una enfermedad cardiovascular o la probabilidad de propensión a desarrollar una enfermedad o trastorno cardiovascular con un SNP de alelo (variante) de una molécula de ácido nucleico de interés, solo o en combinación con otros factores. En un modo de realización, se usa una métrica (por ejemplo, un algoritmo o fórmula matemática) para determinar si existe una correlación entre la presencia de un SNP de variante de alelo y una enfermedad cardiovascular o un acontecimiento cardiovascular adverso.

Procedimientos de medicina personalizada de la invención

La firma de SNP identificada por los autores de la presente invención también es adecuada para seleccionar pacientes para aplicar un tratamiento cardiovascular a un paciente en el que dicho paciente se ha seleccionado previamente basándose en la presencia de un factor de riesgo para CVD calculado a partir de dicha firma de SNP. Por tanto, un objeto de la presente memoria descriptiva es proporcionar un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad cardiovascular con una terapia cardiovascular en el que el paciente se selecciona para dicha terapia basándose en la presencia, en una muestra aislada de dicho sujeto, de un polimorfismo en la posición 27 en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que dicho polimorfismo en dicha posición 27 es C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11.

Otro objeto de la presente memoria descriptiva es proporcionar el uso de una terapia cardiovascular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad cardiovascular en el que el paciente se selecciona para dicha terapia basándose en la presencia, en una muestra aislada de dicho sujeto, de un polimorfismo en la posición 27 en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que dicho polimorfismo en dicha posición 27 es C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11.

Otro objeto de la presente memoria descriptiva es proporcionar una terapia cardiovascular para su uso en el tratamiento de un paciente de una enfermedad cardiovascular en el que el paciente se selecciona para dicha terapia basándose en la presencia, en una muestra aislada de dicho sujeto, de un polimorfismo en la posición 27 en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que dicho polimorfismo en dicha posición 27 es C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11.

Las expresiones “terapia cardiovascular” y “enfermedad cardiovascular” se han explicado en detalle previamente. En

un modo de realización preferido, la terapia cardiovascular es una terapia con beta-bloqueante o terapia con verapamilo. En aún otro modo de realización, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de aorta o una combinación de los mismos.

Los agentes que forman la terapia cardiovascular pueden administrarse a humanos y otros animales mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo por vía oral, por vía nasal, como, por ejemplo, un aerosol, por vía rectal, por vía intravaginal, por vía parenteral, por vía intracisternal y por vía tópica, como con polvos, ungüentos o gotas, incluyendo por vía bucal y por vía sublingual. Pueden variarse los niveles de dosificación reales del uno o más agentes administrados en los procedimientos de la presente invención de manera que se obtiene una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr una respuesta en un animal. La cantidad eficaz real puede determinarse por un experto en la técnica usando experimentación de rutina y puede variar según el modo de administración. Además, la cantidad eficaz puede variar según una variedad de factores que incluyen el tamaño, edad y sexo del individuo que se está tratando. Además, la gravedad del estado que se está tratando, así como la presencia o ausencia de otros componentes con respecto al régimen de tratamiento individual influirá en la dosificación real. La cantidad eficaz o nivel de dosificación dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del uno o más agentes particulares empleados, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción de los agentes particulares que se están empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con los agentes particulares empleados, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historia clínica previa del animal, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

El procedimiento de medicina personalizada de la memoria descriptiva también puede incluir la determinación de factores de riesgo clásicos tales como edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, tabaquismo, nivel de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, historia de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal, o hipertrofia ventricular izquierda, historia de consumo de alcohol, historia de tabaquismo, historia de ejercicio, dieta e historia familiar de enfermedad cardiovascular; y correlacionar la presencia del SNP y uno o más factores de riesgo de enfermedad cardiovascular con la necesidad de una terapia cardiovascular personalizada, posiblemente temprana y agresiva, en la que una correlación positiva identifica al sujeto como que tiene un riesgo alterado, en particular aumentado, de una enfermedad o trastorno cardiovascular adversos. En un modo de realización, el procedimiento implica además seleccionar un régimen de tratamiento adecuado. En otro modo de realización, el procedimiento implica además administrar el régimen de tratamiento al sujeto.

Procedimientos para determinar el riesgo cardiovascular en un sujeto

Otro objeto de la presente invención es la mejora de los CVRF que se usan en la actualidad 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 CVD y/o con un riesgo de complicaciones de CVD que incluyen, pero no se limitan a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de aorta y fallecimiento. Los CVRF que se usan en la actualidad incluyen, pero no se limitan a, la función de Framingham original, la función Framingham adaptada (tal como, pero sin limitarse a, función REGICOR), función PROCAM, función SCORE y función QRISK. La mejora de las funciones de Framingham, PROCAM, REGICOR y QRISK se muestra como funciones 1a y 1b.

Función 1a

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:

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

donde,

• 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<sub>i</sub>: acontecimiento coronario (infarto de miocardio o angina mortal o no mortal) en un periodo de 10 años para un individuo “i”.

b. CRF<sub>p,i</sub>: 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” incluida en la ecuación para un individuo “i”. Las variantes incluidas actualmente en el modelo se muestran en la tabla B.

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

• exp: exponenciación natural.

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

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

15 b.  $\beta_{CRF_p}$  logaritmo de la razón de riesgo correspondiente al factor de riesgo coronario clásico “p”. Los valores de  $\beta$  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”.

20 •  $\sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * SNP_{j,i}$  : donde

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

25 b.  $\beta_{SNP_j}$  logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a la variante genética “j”. El posible intervalo de valores de  $\beta$  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” incluida en la ecuación para un individuo “i”.

30 •  $\overline{CFR_p}$  : 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 alelos de riesgo promedio para la variante genética “j” en la población.

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

35 Tabla A. Lista de factores de riesgo coronario incluidos en el modelo, logaritmo de la razón de riesgo,  $\beta_{CRF_p}$ , para cada factor de riesgo clásico por sexo, intervalo de los valores promedios 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).

40

	CRF <sub>p</sub>	$\beta_{CRF_p}$ para hombres	$\beta_{CRF_p}$ para mujeres	$\overline{CFR_p}$
FRAMINGHAM (original o adaptación)	Edad	0,048	0,338	35-74
	Edad <sup>2</sup>	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-Alta	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
<b>PROCAM</b>				
	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
	Historia familiar de MI	0,382	-	1-45
	Diabetes	0,399	-	0-30
<b>QRISK</b>				
	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 <sup>2</sup> )	0,015	0,022	22-32
	Historia familiar de CVD prematura	0,206	0,262	1-45
	Tabaquismo	0,425	0,349	0-60
	Puntuación de Townsend de la zona de resultados	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 de SBP*tratamiento para la HTN	-0,004	-0,007	---
	Supervivencia media $\hat{S}$	0,951 (0,01-9,00)	0,978 (0,01-9,00)	

Tabla B. Variantes incluidas actualmente en el modelo. Logaritmo de la razón de riesgo (intervalo de posibles valores),  $\beta_{SNP_j}$ , y número de copias de alelos de riesgo promedio (intervalo de posibles valores),  $\overline{SNP_j}$ , para cada variante genética.

5

SNP <sub>j</sub>	$\beta_{SNP_j}$	$\overline{SNP_j}$
rs1333049	0,30010 (0-0,80)	0,94 (0,3-2,8)
rs599839	0,16551 (0-0,60)	1,54 (0,3-2,8)
rs17465637	0,12222 (0-0,60)	1,44 (0,3-2,8)
rs501120	0,17395 (0-0,60)	1,74 (0,3-2,8)
rs2943634	0,19062 (0-0,60)	1,32 (0,3-2,8)
rs6922269	0,20701 (0-0,60)	0,50 (0,3-2,8)
rs9982601	0,1823 (0-0,60)	0,26 (0,3-2,8)
rs12526453	0,1133 (0-0,60)	1,10 (0,3-2,8)
rs6725887	0,1570 (0-0,60)	0,28 (0,3-2,8)
rs9818870	0,1398 (0-0,60)	0,34 (0,3-2,8)
rs3184504	0,1222 (0-0,60)	0,76 (0,3-2,8)
Otros SNP	0,1200 (0-0,60)	0,3-2,8 (0,3-2,8)

Función 1b

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:

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

donde

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

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

b. CRF<sub>p,i</sub>: 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.

c. GSQ<sub>q,i</sub>: quintil de puntuación genética “q” según la distribución del número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para las variantes genéticas incluidas en la ecuación en el nivel de población para un individuo “i”. Las variantes incluidas actualmente en el modelo se muestran en la tabla D.

•  $\hat{S}$ : 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.  $\beta_{\text{CRF}_p}$  logaritmo de la razón de riesgo correspondiente al factor de riesgo coronario clásico “p”. Los valores de  $\beta$  para cada factor de riesgo coronario “p” se muestran en la tabla C.

c. CRF<sub>p,i</sub>: valor de cada factor de riesgo coronario “p” incluido en la ecuación para un individuo “i”.

•  $\sum_{q=1}^Q \beta_{\text{GSQ}_q} * \text{GSQ}_{q,i}$  : donde

a.  $\sum_{q=1}^Q$  función sumatoria a lo largo de los Q(5) quintiles.

b.  $\beta_{\text{GSQ}_q}$ : logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a diferentes quintiles de puntuación genética (GSQ) “q”. El posible intervalo de valores de  $\beta$  para cada quintil “q” se muestra en la tabla D.

c. GSQ<sub>q,i</sub>: quintil de puntuación genética “q” según la distribución del número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para las variantes genéticas incluidas en la ecuación en el nivel de población para un individuo “i”.

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

•  $\overline{\text{GSQ}_Q}$  : valores desde 1 hasta 5 de los diferentes quintiles para el quintil de puntuación genética “q” en la población.

Tabla C. Lista de factores de riesgo coronario incluidos en el modelo, logaritmo de la razón de riesgo,  $\beta_{CRFP}$ , para cada factor de riesgo clásico por sexo, intervalo de los valores promedios 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).

5

	CRFP	$\beta_{CRFP}$ para hombres	$\beta_{CRFP}$ para mujeres	$\overline{CFR}_p$
FRAMINGHAM (original o adaptación)	Edad	0,048	0,338	35-74
	Edad <sup>2</sup>	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-Alta	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
	Historia familiar 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 <sup>2</sup> )	0,015	0,022	22-32
	Historia familiar de CVD prematura	0,206	0,262	1-45
	Tabaquismo	0,425	0,349	0-60
	Puntuación de Townsend de la zona de resultados	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 de SBP*tratamiento para la HTN	-0,004	-0,007	---
	Supervivencia media $\hat{S}$	0,951 (0,01-9,00)	0,978 (0,01-9,00)	

Tabla D. Definición de quintiles de puntuación genética (GSQ<sub>q</sub>) según el número de alelos de riesgo y logaritmo de la razón de riesgo (intervalo de posibles valores),  $\beta_{GSQq}$ , para los quintiles de puntuación genética.

GSQ <sub>q</sub>	β <sub>GSQq</sub>
1 (0-6/9 alelos de riesgo)	0
2 (7/10 alelos de riesgo)	0,2 (0-0,8)
3 (9/11 alelos de riesgo)	0,4 (0-1,2)
4 (10/12 alelos de riesgo)	0,6 (0-1,6)
5 (11/12-22 alelos de riesgo)	0,8 (0-2,0)

Estos quintiles se construirán según las frecuencias de alelos de las siguientes variantes genéticas (véase la tabla 1) (rs1333049, rs599839, rs17465637, rs501120, rs2943634, rs6922269, rs9982601, rs12526453, rs6725887, rs9818870, rs3184504).

Función 1c

El riesgo coronario o cardiovascular se calculará usando las siguientes ecuaciones que usan la función de riesgo SCORE:

Primera etapa: calcular la combinación lineal de factores de riesgo

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

donde

- *colesterol<sub>i</sub>*: nivel de colesterol para el individuo “i” en mmol/l.
- *β<sub>col</sub>*: logaritmo de la razón de riesgo correspondiente al colesterol (tabla E).
- *SBP<sub>i</sub>*: tensión arterial sistólica para el individuo “i” en mmHg.
- *β<sub>SBP</sub>*: logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a la tensión arterial sistólica (tabla E).
- *actual<sub>i</sub>*: tabaquismo actual para el individuo “i” (1: actual, 0: antiguo/nunca).
- *β<sub>fumador</sub>*: logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a la tensión arterial sistólica (tabla E).

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

- a.  $\sum_{j=1}^J$  función sumatoria a lo largo de las J variantes genéticas.
- b. *β<sub>SNP<sub>j</sub></sub>* logaritmo de la razón de riesgo correspondiente 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<sub>j,i</sub>*: número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para una variante genética específica “j” incluida en la ecuación para un individuo “i”.
- d.  $\overline{SNP_j}$ : número de copias de alelos 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 referencia

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

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

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 a los 10 años

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

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

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

Cuarta etapa: calcular la probabilidad de tener el acontecimiento durante los 10 años de seguimiento

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

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

$Riesgo\ de\ CVD_{10} = [Riesgo\ de\ CHD_{10}(edad)] + [Riesgo\ distinto\ de\ CHD_{10}(edad)]$

20 Tabla E

	CHD	CVD distinta de CHD
Fumador actual, $\beta_{fumador}$	0,71	0,63
Colesterol (mmol/l), $\beta_{col}$	0,24	0,02
Tensión arterial sistólica (mmHg), $\beta_{SBP}$	0,018	0,022

CHD: cardiopatía coronaria

25 CVD: enfermedad cardiovascular

Tabla F

País		CHD		CVD distinta de CHD	
		A	p	$\alpha$	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

30 CHD: cardiopatía coronaria

CVD: enfermedad cardiovascular

35 De manera sorprendente, la combinación de marcadores de SNP incluidos en la presente invención y expuestos en la tabla 1 y que usan las funciones descritas en las funciones 1a a 1c anteriormente, han demostrado obtener una validez más alta y una validación superior a la hora de predecir una CVD y/o complicaciones de CVD que los obtenidos usando los factores de riesgo clásicos y usando las funciones que se usan actualmente o funciones publicadas incluyendo información genética. Además, también se mejoró la reclasificación.

40 Medios implementados por ordenador

Otro objeto de la presente memoria descriptiva es la provisión de un programa informático o medios legibles por ordenador que contienen medios para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos de la invención. La implementación por ordenador puede lograrse usando un programa informático que proporciona instrucciones en una forma legible por ordenador. El ordenador recogerá los datos, analizará los datos de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, y después proporcionará un resultado del análisis. Por tanto, en otro aspecto, la invención de la memoria descriptiva se refiere a un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo un procedimiento de la invención.

50 Se pueden usar diferentes tipos de lenguaje informático para proporcionar instrucciones en una forma legible por ordenador. Por ejemplo, el programa informático puede escribirse usando lenguajes tales como lenguajes de comando Shell en C, C++, Microsoft C#, Microsoft Visual Basic, FORTRAN, PERL, HTML, JAVA, S, UNIX o LINUX, tales como secuencia de comandos de Shell en C. "R", un dialecto de lenguaje S, es un ejemplo de un dialecto con atributos que facilitan análisis como los presentados en el presente documento (véase <http://cran.us.r-project.org>).

55

Pueden usarse diferentes tipos de ordenadores para ejecutar un programa para realizar técnicas de análisis descritas en el presente documento. Los programas informáticos para realizar técnicas de análisis descritas en el presente documento pueden ejecutarse en un ordenador que tiene suficiente memoria y capacidad de procesamiento. Un ejemplo de un ordenador adecuado es uno que tenga un procesador basado en Intel Pentium (g) de 200 MHz o superior, con 64 MB o más de memoria principal. Se conocen bien en la técnica sistemas informáticos equivalentes y superiores. Pueden emplearse sistemas operativos convencionales para diferentes tipos de ordenadores. Los ejemplos de sistemas operativos para un procesador basado en Intel Pentium (2) incluyen la familia de Microsoft Windows TM tal como Windows NT, Windows XP y Windows 2000 y LINUX. Los ejemplos de sistemas operativos para ordenadores Apple incluyen los sistemas operativos OSX, UNIX y LINUX. Otros ordenadores y sus sistemas operativos se conocen bien en la técnica. En diferentes realizaciones, se usa el lenguaje R en un ordenador basado en Intel con procesadores Pentium m a 866 MHz dobles de 4 GB de RAM que ejecutan el sistema operativo LINUX o un ordenador IBM que ejecuta el sistema operativo AIX con un ordenador basado en Intel que ejecuta el sistema operativo Windows NT o XP como terminal de x-windows.

#### 15 Kits de la invención

La invención se refiere además a un kit para determinar la presencia de los marcadores polimórficos usados en los procedimientos de la invención, que comprende en su totalidad o en parte: reactivos de amplificación para amplificar fragmentos de ácido nucleico que contienen marcadores de SNP y reactivos de detección para genotipar marcadores de SNP.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad de los polimorfismos en las posiciones 27 dentro de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 10 tal como se definió en la tabla 1 anteriormente.

Un experto en la técnica reconocerá que, basándose en los SNP e información de secuencia asociada divulgada en el presente documento, pueden desarrollarse reactivos de detección y usarse para someter a ensayo cualquier SNP de la presente invención de manera individual o en combinación, y tales reactivos de detección pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de sistema o kit establecidos que se conocen bien en la técnica. Los kits pueden comprender además un cuestionario de factores clínicos clásicos.

Se pretende que los términos “kits” y “sistemas”, tal como se usan en el presente documento en el contexto de reactivos de detección de SNP, se refieran a objetos o dispositivos tales como combinaciones de múltiples reactivos de detección de SNP, o uno o más reactivos de detección de SNP en combinación con uno o más de otros tipos de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, envases, presentaciones tales como presentaciones destinadas para venta comercial, sustratos a los que se unen reactivos de detección de SNP, componentes de hardware electrónicos, etc.). Por consiguiente, la presente invención proporciona además kits y sistemas de detección de SNP, que incluyen, pero no se limitan a, conjuntos de cebadores y sondas presentados para la venta (por ejemplo, conjuntos de cebadores/sondas TaqMan), matrices/micromatrices de moléculas de ácido nucleico, y perlas que contienen una o más sondas, cebadores, u otros reactivos de detección para detectar uno o más SNP de la presente invención. Los kits/sistemas pueden incluir opcionalmente diversos componentes de hardware electrónicos; por ejemplo, matrices (“chips de ADN”) y sistemas microfluídicos (sistemas de “nanolaboratorio”) proporcionados por diversos fabricantes que comprenden normalmente componentes de hardware. Otros kits/sistemas (por ejemplo, conjuntos de cebadores/sondas) pueden no incluir componentes de hardware electrónicos, sino que pueden estar compuestos por, por ejemplo, uno o más reactivos de detección de SNP (junto con, opcionalmente, otros reactivos bioquímicos) presentados en uno o más envases.

En algunos modos de realización, un kit de detección de SNP contiene normalmente uno o más reactivos de detección y otros componentes (por ejemplo, un tampón, enzimas tales como ADN polimerasas o ligasas, nucleótidos de extensión de cadena tales como desoxirribonucleótido trifosfatos, y en el caso de reacciones de secuenciación de ADN de tipo Sanger, nucleótidos de terminación de cadena, secuencias de control positivo, secuencias de control negativo, y similares) necesarios para llevar a cabo un ensayo o reacción, tal como amplificación y/o detección de una molécula de ácido nucleico que contiene SNP. Un kit puede contener además medios para determinar la cantidad de un ácido nucleico diana, y medios para comparar la cantidad con un patrón, y puede comprender instrucciones para usar el kit para detectar la molécula de ácido nucleico que contiene SNP de interés. En un modo de realización de la presente invención, se proporcionan kits que contienen los reactivos necesarios para llevar a cabo uno o más ensayos para detectar uno o más SNP divulgados en el presente documento. En un modo de realización preferido de la presente invención, los kits/sistemas de detección de SNP están en forma de matrices de ácido nucleico, o kits compartimentalizados, incluyendo sistemas microfluídicos/de “nanolaboratorio”.

Los kits/sistemas de detección de SNP pueden contener, por ejemplo, una o más sondas, o pares de sondas, que se hibridan con una molécula de ácido nucleico en o cerca de cada posición de SNP diana. Pueden incluirse múltiples pares de sondas específicas para alelos en el kit/sistema para someter a ensayo simultáneamente grandes números de SNP, al menos uno de los cuales es un SNP de la presente invención. En algunos kits/sistemas, las sondas específicas para alelos se inmovilizan en un sustrato tal como una matriz o perla. Por ejemplo, el mismo sustrato

puede comprender sondas específicas para alelos para detectar al menos 1; 10; 100; 1000; 10.000; 100.000; 500.000 (o cualquier otro número entre medias) o sustancialmente todos los SNP divulgados en el presente documento.

5 Preferiblemente, el kit comprende varios oligonucleótidos que se hibridarán específicamente con las secuencias de ácido nucleico definidas en la tabla 1 o con secuencias que flanquean dichas regiones. Estos oligonucleótidos permitirán la amplificación específica del polinucleótido en el que va a evaluarse la posición polimórfica a partir de una plantilla de ADNc o ADN genómico humano, usando PCR. Lo más preferiblemente, estos oligonucleótidos también permitirán el genotipado específico de estos sitios polimórficos actuando como cebadores, sondas, o  
10 sustratos de ligamiento que permiten la diferenciación de alelos polimórficos. Alternativamente, estos oligonucleótidos pueden ser adecuados para su uso en procedimientos que no dependen de amplificación previa del ADN de partida, tales como ensayos Invader y procedimientos de detección basados en ligamiento. Preferiblemente, los oligonucleótidos u otros componentes del kit incluirán una etiqueta detectable, por ejemplo, una etiqueta fluorescente, etiqueta de enzima, etiqueta de dispersión de luz, etiqueta de masa, u otra etiqueta. Alternativamente,  
15 puede lograrse la detección mediante procedimientos de RFLP. Además, el kit puede incluir una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico que permiten la detección de secuencias de ácido nucleico o productos génicos correspondientes a diferentes polimorfismos tal como se define en la tabla 1. El kit también puede contener opcionalmente instrucciones para su uso, que pueden incluir una lista de los polimorfismos que se correlacionan con un tratamiento o tratamientos particulares para una enfermedad o enfermedades y/o una declaración o lista de las  
20 enfermedades para las que un polimorfismo o polimorfismos particulares se correlacionan con la eficacia y/o seguridad de un tratamiento.

Los términos “matrices”, “micromatrices” y “chips de ADN” se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a una matriz de distintos polinucleótidos fijados a un sustrato, tal como vidrio, plástico,  
25 papel, nailon u otro tipo de membrana, filtro, chip, o cualquier otro soporte sólido adecuado. Los polinucleótidos pueden sintetizarse directamente sobre el sustrato, o sintetizarse por separado del sustrato y entonces fijarse al sustrato. En un modo de realización, la micromatriz se prepara y se usa según los procedimientos descritos en patente estadounidense n.º 5.837.832, Chee *et al.*, solicitud PCT WO95/11995 (Chee *et al.*), Lockhart, D. J. *et al.* (1996; Nat. Biotech. 14: 1675-1680) y Schena, M. *et al.* (1996; Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614-10619), todos los  
30 cuales se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia. En otros modos de realización, tales matrices se producen mediante los procedimientos descritos por Brown *et al.*, patente estadounidense n.º 5.807.522.

Se revisan matrices de ácido nucleico en las siguientes referencias: Zammatteo *et al.*, “New chips for molecular biology and diagnostics”, Biotechnol Annu Rev. 2002; 8:85-101; Sosnowski *et al.*, “Active microelectronic array system for DNA hybridization, genotyping and pharmacogenomic applications”, Psychiatr Genet. diciembre de 2002;  
35 12(4): 181-92; Heller, “DNA microarray technology: devices, systems, and applications”, Annu Rev Biomed Eng. 2002; 4: 129-53. Epub de 22 de marzo de 2002; Kolchinsky *et al.*, “Analysis of SNPs and other genomic variations using gel-based chips”, Hum Mutat. abril de 2002; 19(4):343-60; y McGall *et al.*, “High-density genechip oligonucleotide probe arrays”, Adv Biochem Eng Biotechnol. 2002; 77:21-42.

Cualquier número de sondas, tales como sondas específicas para alelos, puede implementarse en una matriz, y cada sonda o par de sondas puede hibridarse con una posición de SNP diferente. En el caso de sondas de polinucleótido, pueden sintetizarse en áreas designadas (o sintetizarse por separado y luego fijarse a áreas designadas) sobre un sustrato usando un procedimiento químico dirigido por luz. Cada chip de ADN puede contener,  
45 por ejemplo, de miles a millones de sondas de polinucleótido sintéticas individuales dispuestas en un patrón de tipo rejilla y miniaturizadas (por ejemplo, del tamaño de una moneda de diez centavos). Preferiblemente, las sondas se unen a un soporte sólido en una matriz dirigida, ordenada.

Una micromatriz puede estar compuesta por un gran número de polinucleótidos monocatenarios únicos fijados a un soporte sólido. Los polinucleótidos típicos tienen de manera preferible aproximadamente 6-60 nucleótidos de longitud, de manera más preferible aproximadamente 15-30 nucleótidos de longitud, y de la manera más preferible aproximadamente 18-25 nucleótidos de longitud. Para determinados tipos de micromatrices u otros kits/sistemas de detección, puede ser preferible usar oligonucleótidos que solo tienen aproximadamente 7-20 nucleótidos de longitud. En otros tipos de matrices, tales como matrices usadas junto con tecnología de detección quimioluminiscente, las longitudes de sonda preferidas pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 15-80 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 50-70 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 55-65 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente de aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. La micromatriz o kit de detección puede contener polinucleótidos que cubren la secuencia en 5' o 3' conocida del sitio de SNP diana, polinucleótidos secuenciales que cubren la secuencia completa de un gen/transcrito; o polinucleótidos únicos seleccionados de áreas particulares a lo largo de la longitud de una secuencia de gen/transcrito diana, particularmente áreas que corresponden a uno o más SNP divulgados en el presente documento. Los polinucleótidos usados en la micromatriz o kit de detección pueden ser específicos para un SNP o varios SNP de interés (por ejemplo, específicos para un alelo de SNP particular en un sitio de SNP diana, o específicos para alelos de SNP particulares en múltiples sitios de SNP diferentes), o específicos para un gen/transcrito o genes/transcritos  
60 polimórficos de interés.

Los ensayos de hibridación basados en matrices de polinucleótido se basan en las diferencias de estabilidad de hibridación de las sondas con respecto a variantes de secuencia diana perfectamente apareadas o con apareamiento erróneo. Para el genotipado de SNP, generalmente es preferible que las condiciones de rigurosidad usadas en ensayos de hibridación sean lo suficientemente altas como para que puedan diferenciarse moléculas de ácido nucleico que difieren entre sí en tan solo una sola posición de SNP (por ejemplo, se diseñan ensayos de hibridación de SNP típicos de manera que solo se produzca hibridación si está presente un nucleótido particular en una posición de SNP, pero no se producirá si está presente un nucleótido alternativo en esa posición de SNP). Tales condiciones de alta rigurosidad pueden ser preferibles cuando se usan, por ejemplo, matrices de ácido nucleico de sondas específicas para alelos para detección de SNP. Tales condiciones de alta rigurosidad se describen en la sección anterior, y las conocen bien los expertos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

En otros modos de realización, las matrices se usan junto con tecnología de detección quimioluminiscente. Las siguientes patentes y solicitudes de patente, todas las cuales se incorporan en el presente documento como referencia, proporcionan información adicional perteneciente a la detección quimioluminiscente: las solicitudes de patente estadounidense con n.º de serie 10/620.332 y 10/620.333 describen enfoques quimioluminiscentes para la detección de micromatrices; las patentes estadounidenses n.º 6.124.478, 6.107.024, 5994073, 5981768, 5871938, 5843681, 5800999, y 5773628 describen procedimientos y composiciones de dioxetano para realizar detección quimioluminiscente; y la solicitud estadounidense publicada US2002/0110828 divulga procedimientos y composiciones para controles de micromatriz.

En un modo de realización de la invención, una matriz de ácido nucleico puede comprender una matriz de sondas de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud. En realizaciones adicionales, una matriz de ácido nucleico puede comprender cualquier número de sondas, en las que al menos una sonda es capaz de detectar uno o más SNP divulgados en las tablas 1-10 y/o al menos una sonda comprende un fragmento de una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las divulgadas en el presente documento, y secuencias complementarias a las mismas, comprendiendo dicho fragmento al menos aproximadamente 8 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 10, 12, 15, 16, 18, 20, más preferiblemente 22, 25, 30, 40, 47, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, o más nucleótidos consecutivos (o cualquier otro número entre medias) y que contiene (o que es complementario a) un SNP. En algunos modos de realización, el nucleótido complementario al sitio de SNP está a menos de 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido(s) del centro de la sonda, más preferiblemente en el centro de dicha sonda.

Puede sintetizarse una sonda de polinucleótido sobre la superficie del sustrato usando un procedimiento de acoplamiento químico y un aparato de aplicación de chorro de tinta, tal como se describe en la solicitud PCT WO95/251116 (Balteschweiler *et al.*) que se incorpora en el presente documento en su totalidad por referencia. En otro aspecto, puede usarse una matriz "enrejada" análoga a una inmunotransferencia por puntos (o ranuras) para disponer y unir oligonucleótidos o fragmentos de ADNc a la superficie de un sustrato usando un sistema a vacío, procedimientos de unión química, mecánica, por UV o térmica. Una matriz, tal como las descritas anteriormente, puede producirse manualmente o usando dispositivos disponibles (aparato de inmunotransferencia por ranuras o inmunotransferencia por puntos), materiales (cualquier soporte sólido adecuado) y máquinas (incluyendo instrumentos robóticos), y pueden contener 8, 24, 96, 384, 1536, 6144 o más polinucleótidos, o cualquier otro número que se preste al uso eficaz de instrumentos disponibles comercialmente.

Los usos de los kits según la invención implican normalmente incubar una muestra de prueba de ácidos nucleicos con una matriz que comprende una o más sondas que corresponden a al menos una posición de SNP de la presente invención, y someter a ensayo para determinar la unión de un ácido nucleico de la muestra de prueba con una o más de las sondas. Las condiciones para incubar un reactivo de detección de SNP (o un kit/sistema que emplea uno o más de tales reactivos de detección de SNP) con una muestra de prueba varían. Las condiciones de incubación dependen de factores tales como el formato empleado en el ensayo, los procedimientos de detección empleados, y el tipo y la naturaleza de los reactivos de detección usados en el ensayo. Un experto en la técnica reconocerá que uno cualquiera de los formatos de ensayo de matriz, amplificación e hibridación comúnmente disponibles puede adaptarse fácilmente para detectar los SNP divulgados en el presente documento.

Un kit/sistema de detección de SNP de la presente invención puede incluir componentes que se usan para preparar ácidos nucleicos a partir de una muestra de prueba para la amplificación y/o detección posterior de una molécula de ácido nucleico que contiene SNP. Tales componentes de preparación de la muestra pueden usarse para producir extractos de ácido nucleico, incluyendo ADN y/o ARN, a partir de cualquier líquido corporal. En un modo de realización preferido de la invención, el líquido corporal es sangre, saliva o hisopos bucales. Las muestras de prueba usadas en los procedimientos descritos anteriormente variarán basándose en factores tales como el formato de ensayo, la naturaleza del procedimiento de detección, y los tejidos, células o extractos específicos usados como muestra de prueba que va a someterse a ensayo. En la técnica se conocen bien procedimientos de preparación de ácidos nucleicos y pueden adaptarse fácilmente para obtener una muestra que sea compatible con el sistema utilizado.

En aún otra forma del kit, además de reactivos para la preparación de ácidos nucleicos y reactivos para la detección de uno de los SNP de esta invención, el kit puede incluir un cuestionario que pregunta sobre factores clínicos no

genéticos tales como los que se sabe que están asociados con CVD tales como edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, tabaquismo, historia de consumo de alcohol, historia de tabaquismo, historia de ejercicio, dieta, historia familiar de enfermedad cardiovascular, colesterol total, niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, historia de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal, o hipertrofia ventricular izquierda.

Otra forma de kit contemplado por la presente invención es un kit compartimentalizado. Un kit compartimentalizado incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en envases separados. Tales envases incluyen, por ejemplo, pequeños envases de vidrio, envases de plástico, tiras de plástico, vidrio o papel, o material para matriz tal como sílice. Tales envases permiten que el usuario transfiera de manera eficaz reactivos de un compartimento a otro compartimento de manera que las muestras de prueba y los reactivos no se contaminan de manera cruzada, o de un envase a otro recipiente no incluido en el kit, y los agentes o disoluciones de cada envase pueden añadirse de manera cuantitativa de un compartimento a otro o a otro recipiente. Tales envases pueden incluir, por ejemplo, uno o más envases que aceptarán la muestra de prueba, uno o más envases que contienen al menos una sonda u otro reactivo de detección de SNP para detectar uno o más SNP de la presente invención, uno o más envases que contienen reactivos de lavado (tales como solución salina tamponada con fosfato, tampones Tris, etc.), y uno o más envases que contienen los reactivos usados para revelar la presencia de la sonda unida u otros reactivos de detección de SNP. El kit puede comprender además opcionalmente compartimentos y/o reactivos para, por ejemplo, amplificación de ácido nucleico u otras reacciones enzimáticas tales como reacciones de extensión del cebador, hibridación, ligamiento, electroforesis (preferiblemente electroforesis capilar), espectrometría de masas y/o detección fluorescente inducida por láser. El kit también puede incluir instrucciones para usar el kit. Los kits compartimentalizados a modo de ejemplo incluyen dispositivos microfluídicos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Weigl *et al.*, "Lab-on-a-chip for drug development", *Adv Drug Deliv Rev.* febrero de 2003. 24; 55(3):349-77). En tales dispositivos microfluídicos, los envases pueden denominarse, por ejemplo, "compartimentos", "cámaras" o "canales" microfluídicos.

Los dispositivos microfluídicos, que también pueden denominarse sistemas de "nanolaboratorio", sistemas microelectromecánicos biomédicos (bioMEM), o sistemas integrados multicomponentes, son kits/sistemas a modo de ejemplo de la presente invención para analizar SNP. Tales sistemas miniaturizan y compartimentalizan procesos tales como reacciones de hibridación de sonda/diana, amplificación de ácido nucleico y electroforesis capilar en un solo dispositivo funcional. Tales dispositivos microfluídicos usan normalmente reactivos de detección en al menos un aspecto del sistema, y tales reactivos de detección pueden usarse para detectar uno o más SNP de la presente invención. Se divulga un ejemplo de un sistema microfluídico en la patente estadounidense n.º 5.589.136, que describe la integración de amplificación por PCR y electroforesis capilar en chips. Los sistemas microfluídicos a modo de ejemplo comprenden un patrón de microcanales diseñado sobre una oblea de vidrio, silicio, cuarzo o plástico incluida en un microchip. Los movimientos de las muestras pueden controlarse mediante fuerzas eléctricas, electroosmóticas o hidrostáticas aplicadas a lo largo de diferentes zonas del microchip para crear bombas y válvulas microscópicas funcionales sin piezas móviles. Puede usarse la variación de voltaje medio para controlar el flujo de líquido en las intersecciones entre los microcanales micromecanizados y para cambiar la velocidad de flujo de líquido para bombear a lo largo de diferentes secciones del microchip. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.153.073, Dubrow *et al.*, y la patente estadounidense n.º 6.156.181, Parce *et al.*

Para genotipar SNP, un sistema microfluídico puede integrar, por ejemplo, amplificación de ácido nucleico, extensión de cebador, electroforesis capilar, y un procedimiento de detección tal como detección de fluorescencia inducida por láser.

#### Procedimientos y kits para la detección de la predisposición a desarrollar los factores de riesgo clásicos de CVD

Otro objeto de la presente invención es una combinación particular de marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) asociados con la predisposición a desarrollar los factores de riesgo clásicos de CVD y/o los factores de riesgo clásicos de complicaciones de CVD que incluyen, pero no se limitan a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de aorta y fallecimiento. Los factores de riesgo clásicos de CVD y/o complicaciones de CVD incluyen, pero no se limitan a, diabetes mellitus, altos niveles de colesterol total, altos niveles de colesterol LDL, bajos niveles de colesterol HDL, altos niveles de triglicéridos, obesidad, adicción al tabaco, hipertensión y trombosis.

De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP incluida en la presente invención tal como se expone en la tabla 2 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de diabetes mellitus que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 2 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 2.

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs4506565	TCF7L2	T
rs7903146	TCF7L2	T
rs12255372	TCF7L2	T

rs4132670	TCF7L2	T
rs734312	WFS1	A
rs10811661	CDKN2B	C
rs7756992	CDKAL1	G
rs1111875	HHEX	A
rs7923837	HHEX	A
rs9465871	CDKAL1	C
rs4430796	TCF2	G
rs564398	CDKN2B	G
rs5219	KCNJ11	C
rs13266634	SLC30A8	T
rs5215	KCNJ11	C
rs1801282	PPARG	G
rs7501939	TCF2	C
rs1801208	WSF1	G
rs2383208	CDKN2B	G

Tabla 2

5 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de tener diabetes mellitus que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 2, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar diabetes mellitus.

10 De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP expuesta en la tabla 3 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de altos niveles de colesterol total que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 3 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 3.

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs12664989	ESR1	C
rs1801177	LPL	A
rs268	LPL	G
rs328	LPL	G

15 Tabla 3

20 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de tener altos niveles de colesterol total que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 3, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar altos niveles de colesterol total.

25 De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP expuesta en la tabla 4 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de altos niveles de colesterol LDL que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 4 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 4.

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs4420638	APOC1	G
rs287479	chr13	A
rs11591147	PCSK9	T
rs599839	PSRC1	G
rs780094	GCKR	T
rs12664989	ESR1	C
rs9322331	ESR1	T
rs7412	APOE	C
rs693	APOB	T

Tabla 4

30 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de tener altos niveles de colesterol LDL que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 4, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar altos niveles de colesterol LDL.

35 De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP expuesta en la tabla 5 ha demostrado

obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de bajos niveles de colesterol HDL que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 5 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 5.

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs2066715	ABCA1	T
rs2066718	ABC1	A
rs2230808	ABCA1	A
rs505717	ZNF568	G
rs56937	Chr19	G
rs3734678	PDSS2	C
rs5882	CETP	G
rs1800775	CETP	C
rs708272	CETP	T
rs7412	APOE	T
rs328	LPL	G
rs7007797	LPL	G
rs2230806	ABCA1	A

5

Tabla 5

Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de tener altos niveles de colesterol HDL que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 5, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar altos niveles de colesterol HDL.

10

De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP expuesta en la tabla 6 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de altos niveles de triglicéridos que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 6 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 6.

15

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs7007075	Chr8	T
rs9322331	ESR1	T
rs780094	GCKR	G
rs7007797	LPL	G
rs4420638	APOC1	G
rs662799	APOA5	G
rs6589566	APOA5	G
rs651821	APOA5	C
rs2072560	APOA5	T
rs693	APOB	T
rs1800775	CETP	C
rs328	LPL	G
rs1801177	LPL	A
rs268	LPL	G
rs320	LPL	G
rs2230806	ABCA1	A
rs7412	APOE	C

20

Tabla 6

Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de tener altos niveles de triglicéridos que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 6, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar altos niveles de triglicéridos.

25

De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP expuesta en la tabla 7 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de obesidad que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 7 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 7.

30

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs10510422	PPARG	C
rs10510423	PPARG	G

rs299629	PPARG	G
rs2938392	PPARG	T
rs709157	PPARG	A
rs963163	PPARG	C
rs6602024	PFKP	A
rs2229616	MC4R	A
rs52820871	MC4R	C
rs1106683	intergénico	A
rs7566605	INSIG2	C
rs4471028	GDAP1	G
rs1121980	FTO	T
rs1421085	FTO	C
rs7193144	FTO	C
rs8050136	FTO	A
rs8050136	FTO	A
rs9930506	FTO	G
rs9939609	FTO	A
rs9940128	FTO	A
rs10484922	ESR1	T
rs3778099	ESR1	C
rs3853250	ESR1	C
rs6902771	ESR1	T
rs851982	ESR1	C
rs9322361	ESR1	G
rs1044498	ENPP1	C
rs10490628	CCDC93	A
rs3771942	CCDC93	C
rs9284719	CCDC93	T
rs4994	ADRB3	C
rs1042464	ADIPOQ	T

Tabla 7

5 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de desarrollar obesidad que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 7, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar obesidad.

10 De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP expuesta en la tabla 8 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de adicción al tabaco que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 8 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 8.

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs4142041	CTNNA3	G
rs6474413	CHRNA3	C
rs1044397	CHRNA4	A

15 Tabla 8

20 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de desarrollar adicción al tabaco que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 8, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar adicción al tabaco.

25 De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP expuesta en la tabla 9 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de hipertensión que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 9 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 9.

SNP	GEN	Alelo de riesgo
rs11739136	KCNMB1	T
rs4762	AGT	T
rs699	AGT	C
rs4343	ACE	G
rs4961	ADD1	T

rs2484294	ADRB1	G
rs1042711	ADRB2	C
rs17778257	ADRB2	T
rs1042714	ADRB2	G
rs1800888	ADRB2	T
rs1801704	ADRB2	C
rs2933249	AGTR1	T
rs275652	AGTR1	C
rs387967	AGTR1	C
rs5186	AGTR1	C
rs11091046	AGTR2	A
rs1799983	NOS3	T
rs1800779	NOS3	G
rs1800780	NOS3	G
rs1800782	NOS3	T
rs1800783	NOS3	A
rs2070744	NOS3	C
rs867225	NOS3	A

Tabla 9

5 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de desarrollar hipertensión que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 9, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar hipertensión.

10 De manera sorprendente, la combinación específica de marcadores de SNP tal como se expone en la tabla 10 ha demostrado obtener una capacidad más alta para predecir el desarrollo de trombosis que la obtenida usando los procedimientos que se usan actualmente y/o mediante la consideración de cualquier SNP individual expuesto en la tabla 10 y/o la consideración de un subconjunto de los SNP expuestos en la tabla 10.

SNP	inclos	GEN	Alelo de riesgo
rs234706	1	CBS	A
rs6025	1	F5	A
rs6064	1	F7	A
rs2070011	1	FGA	A
rs1800789	1	FGB	A
rs1764391	1	GJA4	T
rs1062535	0	ITGA2	A
rs1126643	1	ITGA2	T
rs5918	1	ITGB3	C
rs1801131	1	MTHFR	C
rs1801133	1	MTHFR	T
rs11178	1	SERPINE1	C
rs2227631	1	SERPINE1	G
rs2228262	1	THBS1	G
rs1866389	1	THBS4	G
rs7007329	1	PLAT	C
rs917859	1	VWF	A

15 Tabla 10

20 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para la determinación de si un sujeto tiene un riesgo alterado de desarrollar trombosis que comprende determinar en una muestra biológica de dicho sujeto la presencia de los polimorfismos mostrados en la tabla 10, en el que la presencia de los alelos de riesgo es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar trombosis.

25 Otro objeto de la presente memoria descriptiva es un procedimiento para estimar la predisposición a desarrollar los factores de riesgo clásicos de CVD y/o los factores de riesgo clásicos de complicaciones de CVD que incluyen, pero no se limitan a, diabetes mellitus, altos niveles de colesterol total, altos niveles de colesterol LDL, bajos niveles de colesterol HDL, altos niveles de triglicéridos, obesidad, adicción al tabaco, hipertensión y trombosis, que comprende la detección de la presencia de marcadores de SNP expuestos en las tablas 2 a 10.

30 Para calcular el riesgo genético, se contará el número de alelos de riesgo que porta un individuo en las diferentes variantes genéticas asociadas con cada ruta metabólica o factor de riesgo. Cuanto más alto sea el número de alelos de riesgo presentes, más alto será el riesgo de desarrollar cada factor de riesgo.

Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que el análisis de los nucleótidos presentes en los marcadores de SNP incluidos en las tablas 2-10 en el ácido nucleico de un individuo puede realizarse mediante cualquier procedimiento o técnica capaz de determinar nucleótidos presentes en un sitio polimórfico. Resulta obvio en la técnica que los nucleótidos presentes en marcadores de SNP pueden determinarse a partir de cualquier cadena de ácido nucleico o de ambas cadenas. La detección de la presencia de los marcadores de SNP incluidos en las tablas 2-10 se realiza a partir de una muestra biológica del sujeto. La muestra biológica puede ser cualquier muestra posible que contiene ácido nucleico, preferiblemente sangre, células o subfracciones de células (aislándose las células a partir de sangre), saliva, orina, muestra de biopsia y/o muestra tisular.

La invención se refiere además a un kit para determinar la presencia de los marcadores de SNP que comprende en su totalidad o en parte: reactivos de amplificación para amplificar fragmentos de ácido nucleico que contienen marcadores de SNP, reactivos de detección para genotipar marcadores de SNP y software de interpretación para realizar análisis de datos y evaluación del riesgo.

Un objeto adicional de la presente invención son las funciones para calcular la predisposición a desarrollar los factores de riesgo clásicos de CVD y/o los factores de riesgo clásicos de complicaciones de CVD, considerando la combinación particular de marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) asociados con tal predisposición.

**Lista de secuencias**

<110> GENDIAG.EXE

<120> MARCADORES DE RIESGO PARA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

<130> P5000EP00

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 52

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

tcataactaac catatgatca acagttcaaa agcagccact cgcagaggta ag  
52

<210> 2

<211> 52

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

aaagagaaag aaataggagc aggatcaact tccagatata cagagaatat aa  
52

<210> 3

<211> 52

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 623 633 T3

<400> 3  
aaccataata gttatgctga gaagttcttt tttgtcatag tgcaagataa ca  
52  
5 <210> 4  
<211> 52  
10 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 4  
15 ttgaaaaaaaa ttaattctca cactcctaag tgcatttaat ttaagctact tt  
52  
<210> 5  
20 <211> 52  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
25 <400> 5  
aaaagcaagc acatctgtgg cattaccaac attaaatatt tatatacata gt  
52  
30 <210> 6  
<211> 52  
<212> ADN  
35 <213> *Homo sapiens*  
<400> 6  
40 acagttttta ctgtaactgc caataaataa tactcatctt taaaaagaca tc  
52  
<210> 7  
<211> 52  
45 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
50 <400> 7  
ggcaagtacc tgggcacagg gctgcttcat ggcttggac ctggacagtg ga  
52  
<210> 8  
55 <211> 52  
<212> ADN  
60 <213> *Homo sapiens*

ES 2 623 633 T3

<400> 8

acatctgcct ctctagacta taaactcttt ggggctaggt cttctttgtc tt  
52

5

<210> 9

<211> 52

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

15

gctatcattt aaatttggtt gagacacaat atgctggtgc actttctata aa  
52

<210> 10

20

<211> 52

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 10

ctgtgctgct tggcgcctct ctgatatgaa tacactgaca cgtcaaagta ac  
52

30

<210> 11

<211> 52

<212> ADN

35

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

cttgctccag catccaggag gtccggtggt gcacacggct tgagatgcct ga  
40 52

40

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de determinar si un sujeto tiene un riesgo aumentado de tener una enfermedad o trastorno cardiovascular o de determinar la respuesta a una terapia 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 las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 es indicativa de un riesgo aumentado de tener una enfermedad o trastorno cardiovascular o de una baja respuesta a una terapia cardiovascular.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de aorta o una combinación de los mismos.
3. Procedimiento para identificar un sujeto que necesita terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o que necesita terapia cardiovascular profiláctica que comprende las etapas de determinar en una muestra aislada de dicho sujeto la presencia de polimorfismos en las posiciones 27 dentro de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 es indicativa de tener una respuesta disminuida a una terapia cardiovascular o de necesitar terapia cardiovascular temprana y agresiva o necesitar tratamiento cardiovascular profiláctico.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, que comprende además determinar uno o más de un factor de riesgo de una enfermedad o trastorno cardiovascular seleccionado del grupo que consiste en edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, tabaquismo, nivel de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, historia de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal, hipertrofia ventricular izquierda, historia de consumo de alcohol, historia de tabaquismo, historia de ejercicio, dieta e historia familiar de enfermedad o trastorno cardiovascular.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es una muestra de tejido bucal, raspado, o lavado o una muestra de líquido biológico, preferiblemente saliva, orina o sangre.
6. Procedimiento según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la presencia o ausencia del polinucleótido se identifica amplificando o no logrando amplificar un producto de amplificación a partir de la muestra, en el que el producto de amplificación se digiere preferiblemente con una enzima de restricción antes del análisis y/o en el que el SNP se identifica hibridando la muestra de ácido nucleico con una etiqueta de cebador que es un resto detectable.
7. Procedimiento de determinar la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina mortal o no mortal en un periodo de 10 años, en el que el procedimiento comprende una etapa de determinar la presencia de 1 a P factores de riesgo clásicos y de 1 a J polimorfismos en las posiciones 27 en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que dichos polimorfismos en dichas posiciones 27 se seleccionan del grupo de C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 usando la fórmula:

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

donde,

-  $\widehat{S}$  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,

-  $\beta_{CRF_p}$  es el logaritmo de la razón de riesgo correspondiente al factor de riesgo coronario clásico "p" tal como 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,

5 -  $\beta_{SNP_j}$  es el logaritmo de la razón de riesgo correspondiente 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" incluida en la ecuación para un individuo "i",

10

-  $\overline{CFR_p}$  es el valor promedio para el factor de riesgo clásico "p" en la población,

-  $\overline{SNP_j}$  es el número de copias de alelos de riesgo promedio para la variante genética "j" en la población.

15 8. Procedimiento de determinar la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina mortal o no mortal en un periodo de 10 años, en el que el procedimiento comprende una etapa de determinar la presencia de 1 a P factores de riesgo clásicos diferentes y de 1 a Q variantes genéticas diferentes en el que dichas variantes genéticas son polimorfismos en las posiciones 27 en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que dichos polimorfismos en dicha posición 27 se seleccionan del grupo de C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 usando la fórmula:

20

$$1 - \widehat{S}^{\exp \left[ \sum_{p=1}^P \beta_{CRF_p} * CRF_{p,i} + \sum_{q=1}^Q \beta_{GSQ_q} * GSQ_{q,i} - \sum_{p=1}^P \beta_{CRF_p} * \overline{CFR_p} - \sum_{q=1}^Q \beta_{GSQ_q} * \overline{GSQ_q} \right]}$$

25

donde

-  $\widehat{S}$  es la supervivencia media libre de acontecimientos coronarios en la población, esta supervivencia se adaptará a las tasas regionales o nacionales,

30

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

-  $\beta_{CRF_p}$  es el logaritmo de la razón de riesgo correspondiente al factor de riesgo coronario clásico "p" tal como se muestra en la tabla C,

35

-  $CRF_{p,i}$  es el valor de cada factor de riesgo coronario "p" incluido en la ecuación para un individuo "i",

-  $\sum_{q=1}^Q$  es la función sumatoria a lo largo de los Q(5) quintiles,

40 -  $\beta_{GSQ_q}$  es el logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a diferentes quintiles de puntuación genética (GSQ) "q" tal como se muestra en la tabla D,

45

-  $GSQ_{q,i}$  es el quintil de puntuación genética "q" según la distribución del número de alelos de riesgo (0, 1, 2) para las variantes genéticas incluidas en la ecuación en el nivel de población para un individuo "i" construido según las frecuencias de alelos de las variantes genéticas,

-  $\overline{CFR_p}$  es el valor promedio para el factor de riesgo clásico "p" en la población,

-  $\overline{GSQ_q}$  son los valores de desde 1 hasta 5 de los diferentes quintiles para el quintil de puntuación genética "q" en la población.

50

9. Procedimiento de determinar la probabilidad de que un individuo presente un infarto de miocardio o angina

mortal o no mortal en un periodo de 10 años, en el que el procedimiento comprende una etapa de determinar la presencia de 1 a P factores de riesgo clásicos diferentes y 1 a Q variantes genéticas diferentes en el que dichas variantes genéticas son polimorfismos en las posiciones 27 en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 a 11, en el que dichos polimorfismos en dicha posición 27 se seleccionan del grupo de C en SEQ ID NO: 1, A en SEQ ID NO: 2, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, C en SEQ ID NO: 5, A en SEQ ID NO: 6, T en SEQ ID NO: 7, C en SEQ ID NO: 8, C en SEQ ID NO: 9, T en SEQ ID NO: 10 y T en SEQ ID NO: 11 usando las etapas de:

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

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

donde

- $colesterol_i$ : nivel de colesterol para el individuo "i" en mmol/l,
- $\beta_{col}$ : logaritmo de la razón de riesgo correspondiente al colesterol (tabla E),
- $SBP_i$ : tensión arterial sistólica para el individuo "i" en mmHg,
- $\beta_{SPB}$ : logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a la tensión arterial sistólica (tabla E),
- $actual_i$ : tabaquismo actual para el individuo "i" (1: actual, 0: antiguo/nunca),
- $\beta_{fumador}$ : logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a la tensión arterial sistólica (tabla E),

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

- a.  $\sum_{j=1}^J$  función sumatoria a lo largo de las J variantes genéticas,
- b.  $\beta_{SNP_j}$  logaritmo de la razón de riesgo correspondiente a la variante genética "j", el posible intervalo de valores de  $\beta$  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" incluida en la ecuación para un individuo "i",
- d.  $\overline{SNP_j}$ : número de copias de alelos de riesgo promedio para la variante genética "j" en la población, este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional,

(ii) calcular la supervivencia de referencia  $S_0$  para una edad dada usando la función

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

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

donde

- $\alpha, p$ : parámetros de forma y escala de la distribución de Weibull, sus valores se muestran en la tabla F (parámetros)
- $\exp$ : exponenciación natural

(iii) calcular la supervivencia a los 10 años  $S_{10}(edad)$  usando la función

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

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

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

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

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

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

y

(v) calcular la probabilidad de tener un acontecimiento cardiovascular durante los 10 años de seguimiento, Riesgo de CVD<sub>10</sub>, como la suma de riesgo cardiovascular coronario y no coronario usando la función

$$Riesgo\ de\ CVD_{10} = [Riesgo\ de\ CHD_{10}(edad)] + [Riesgo\ distinto\ de\ CHD_{10}(edad)].$$

- 15 10. Procedimiento según las reivindicaciones 7 a 9, en el que se usa una pluralidad de factores de riesgo clásicos "p", seleccionándose dicha pluralidad del grupo de:
- sexo, edad, colesterol total, colesterol HDL, tensión arterial, diabetes y tabaquismo,
  - edad, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, tensión arterial sistólica, historia familiar de infarto de miocardio y diabetes,
  - sexo, Log(edad/10), colesterol total/colesterol HDL, índice de masa corporal, historia familiar de CVD prematura, tabaquismo, puntuación de Townsend de la zona de resultados, tensión arterial sistólica, tratamiento para la hipertensión e interacción de SBP\*tratamiento para la HTN.
11. Kit que comprende reactivos para detectar la identidad de los nucleótidos en la posición 27 dentro de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11.
- 30 12. Kit según la reivindicación 11, que comprende uno o más pares de cebadores específicos para la amplificación de una región que comprende al menos la posición 27 dentro de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 11.