

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 446**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2010 PCT/EP2010/058064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10142713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2010 E 10725412 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2440674**

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

30 Prioridad:

09.06.2009 EP 09162329

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

28.07.2017

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 FERNANDEZ, SERGIO;

SALGADO GÓMEZ, JOAN y

ORDOVÁS MUNOZ, JOSÉ, MARIA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 627 446 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 métodos para determinar si un sujeto, particularmente un sujeto humano, está en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, tener enfermedad cardiovascular o experimentar una complicación de una enfermedad cardiovascular. La presente invención también se refiere al uso de tales marcadores y métodos para monitorizar el estado de riesgo y/o enfermedad cardiovascular en un sujeto o los efectos de medidas/agentes preventivos y/o terapéuticos sobre sujetos con riesgo cardiovascular o enfermedad cardiovascular.

15 **Antecedentes técnicos**

Enfermedad cardiovascular (CVD) es un término para enfermedades cardíacas y de los vasos sanguíneos, incluyendo (entre otras) cardiopatía isquémica (que es el tipo de CVD más común en los países industrializados; este trastorno se refiere a problemas con la circulación de la sangre al músculo cardíaco), enfermedad cerebrovascular (se refiere a 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 la piernas). Los sujetos con CVD pueden desarrollar varias complicaciones (denominadas en lo sucesivo en el presente documento complicaciones de CVD) incluyendo, pero sin limitarse a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma aórtico y muerte.

25 El *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 los factores de riesgo, que se usa y se acepta ampliamente en la actualidad. Se ha reconocido que varios factores de riesgo independientes son 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 factores de riesgo modificables principales son tabaquismo, hipertensión arterial, hipercolesterolemia (en particular nivel alto de colesterol-LDL) y diabetes mellitus (Circulation 2000; 101; e3-e11).

35 La adaptación de todas las acciones según el riesgo absoluto (la probabilidad de que una persona desarrolle una enfermedad coronaria en un periodo de tiempo determinado) es importante, porque permite alcanzar un equilibrio adecuado entre eficacia, seguridad y costes de terapia. La estimación del riesgo absoluto requiere añadir la contribución de cada factor de riesgo y el resultado es "la determinación del riesgo global". El *Framingham Heart Study*, tal como se mencionó anteriormente, realizaba una estimación cuantitativa del riesgo global basándose en la contribución de cada factor de riesgo que sirvió a otras sociedades para desarrollar otros algoritmos para otras poblaciones. La incidencia y aparición de enfermedad cardiovascular en Europa difiere significativamente de las de los EE.UU., 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).

45 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 muerte por causa cardiovascular.

50 Sin embargo, pese a todos los esfuerzos realizados para estimar el riesgo y pese a la recomendación para 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 evaluación del riesgo (Circulation 2001; 104; 1863-1867).

55 Los pacientes con un riesgo intermedio se beneficiarían significativamente del uso de más pruebas que permitirían 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 al riesgo de padecer una CVD.

60 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 fue 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, que construyó en esta cohorte una escala de riesgo genético que incluyó 11 polimorfismos. Sin embargo, esta función no mejora la capacidad de discriminación de los factores de riesgo clásicos (el área bajo la curva ROC estaba aumentada solo ligeramente desde 0,764 hasta 0,766).

El segundo, publicado por Kathiresan *et al.* (N Engl J Med. 2008 Mar 20; 358(12):1240-9) también usó una función de riesgo genético que incluyó 9 polimorfismos relacionados con el metabolismo lipídico, 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 Malmo. Aunque esta puntuación no estaba mejorando la capacidad de discriminación de los factores de riesgo clásicos (área bajo la curva ROC, 0,8 con y sin la información genética), se mejoró la reclasificación.

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

Karvanen *et al.*, Genetic Epidemiology, abril de 2009, vol. 33, n.º 3, páginas 237-246 divulga SNP que se consideró que estaban asociados a enfermedades cardiovasculares; esto mismo es cierto para Sekar Kathiresan *et al.*, Nature Genetics, vol. 41, n.º 2, 1 de marzo de 2009, páginas 334-341 y Jeanette Erdmann *et al.*, Nature Genetics, vol. 41, n.º 3, 8 de febrero de 2009, páginas 280-282. La combinación específica tal como se reivindica a continuación en el presente documento no se describe ni se señala en ninguno de estos documentos.

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

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

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un método de determinación de si un sujeto tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso en un sujeto, que comprende las etapas de determinar, en una muestra aislada de dicho sujeto, la presencia de polimorfismos en las posiciones 27 de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, 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 C en SEQ ID NO: 12 es indicativa de un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso.

La invención proporciona además un método 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 en al menos un alelo de polimorfismos en las posiciones 27 de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, 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 C en SEQ ID NO: 12 es indicativa de necesitar terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o de necesitar tratamiento cardiovascular profiláctico.

Aún en un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que consiste en reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 de una secuencia de ácido nucleico del grupo de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, que comprende los pares de cebador específicos para la amplificación de una región que comprende al menos la posición 27 de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12.

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, se asocian a un riesgo de CVD y/o a un riesgo de complicaciones de CVD incluyendo, pero sin limitarse a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma aórtico y muerte. Estos marcadores polimórficos parecen mostrar un valor predictivo independientemente de factores de riesgo clásicos tales como altos niveles de LDL y VLDL, hábitos de tabaquismo, bajos niveles de HDL, altos niveles de lipoproteína A, hipertensión, diabetes, altos niveles de homocisteína, altos niveles de factores hemostáticos, síndrome metabólico, resistencia a insulina, antecedentes familiares y similares y son superiores a los polimorfismos usados individualmente o a los factores de riesgo cardiovascular convencionales.

Método para determinar si un sujeto tiene un riesgo alterado de padecer una enfermedad cardiovascular adversa

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método (en lo sucesivo el primer método de la invención) para determinar si un sujeto tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso 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 del nucleótido en la posición 27 de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo tal como se define en la reivindicación 1 es indicativa de un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso o de una baja respuesta a una terapia cardiovascular.

5 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 la secuencia de nucleótidos que se produce cuando un solo nucleótido del genoma u otra secuencia compartida difiere entre miembros de especies o entre pares de cromosomas de un individuo. Un SNP también puede designarse como una mutación con frecuencia alélica baja mayor de aproximadamente el 1 % en una población definida. Los polimorfismos de un solo nucleótido según la

10 presente solicitud pueden estar comprendidos en secuencias de genes codificantes, regiones de genes no codificantes o las regiones intrónicas entre genes.

La lista de polimorfismos que se usan en este método de la presente invención se facilita en la tabla 1.

SEQ ID NO:	Secuencia que comprende el polimorfismo	Número de registro de dbSNP	Alelo de riesgo	Crom.	Posición en crom.	Cadena	Número de registro/creada
1	TCATACTAACCATATGATCAACAGTTCAAAAGCAGCCACTCGCAGAGGTAAG	rs1333049	C	9	22063860	+	AC_000052/03.03.2008
2	AAAGAGAAAATAAGGACAGGATCAACTCCAGATATACAGAGAAATATAA	rs599839	A	1	109623689	+	NC_000001/03.03.2008
3	AACCAATAGTTATGCTGAGAAGTCTTTTTGTCATAGTGCAGATAACA	rs17465637	C	1	196042601	+	AC_000044/03.03.2008
4	TTGAAAAAATAATCTCACACTCCJAAGTGCATTTAATTTAAGCTACTTT	rs501120	T	10	40757334	+	AC_000053/03.03.2008
5	AAAAGCAAGCACAATGTGGCATTACCAACATTAATTTATATACATAGT	rs2943634	C	2	220837297	+	AC_000045/03.03.2008
6	ACAGTTTTACTGTAACCTGCCAATAAATAACTCATCTTTAAAAAGACATC	rs6922269	A	6	151294678	+	NC_00006/03.03.2008
7	GGCAAGTACCTGGCAGGGCTGCTTCATGGCCCTGGACCTGGACAGTGGGA	rs9982601	T	21	20798890	+	AC_000064/03.03.2008
8	ACATCTGCCCTCTAGACTATAAATCTTTGGGGCTAGGCTCTTTTGCTT	rs12526453	C	6	14155621	+	AC_000049/03.03.2008
9	GCTATCATTTAAATTTGGTTGAGACACAATATGCTGTTGCACCTTCTATAAA	rs6725887	C	2	197498571	+	AC_000045/03.03.2008
10	CTGTGCTGCTTGGTGCCTCTCTGATATGAATACACTGACACGTCAAAGTAAC	rs9818870	T	3	136547031	+	AC_000046/03.03.2008
11	CTTGCTCCAGCATCCAGGAGGTCGGTGGTGACACCGGCTTGAGATGCCTGA	rs3184504	T	12	111511042	+	AC_000055/03.03.2008

Tabla 1: Polimorfismo usado en el método de la invención que incluyen SEQ ID NO: las secuencias que flanquean el polimorfismo y la posición polimórfica (subrayada), el número de registro en dbSNP, el cromosoma y posición en el cromosoma donde se encuentra el polimorfo y el número de registro y la base de datos creada de la secuencia del fragmento cromosómico.

La siguiente realización de la tabla 1A es la selección de la reivindicación 1

Tabla 1A

Patente SEQ ID NO:	Variante	Alelo de riesgo	Crom.	Gen	Posición en crom.	Cadena	Número de registro/creada	Secuencia que comprende el polimorfismo
1	rs1333049	C	9	CDKN2A/2B	22063860	+	AC_000052/03.03.2008	TCATACTAACCAIATGATCAACAGTTCAAAAGCAGCCACTCGCAGAGCTAAG
3	rs17465637	C	1	MIA3	196042601	+	AC_000044/03.03.2008	AACCATAAAGTTATGCTGAGAAAGTTCTTTTTTGTCTATAGTGCAAGA TAACA
4	rs501120	T	10	CXCL12	40757334	+	AC_000053/03.03.2008	ACAGTTTTTACTGTAACCTGCCAATAAAATAACTCATCTTTAAAAAGA CATC
6	rs6922269	A	6	MTHFD1L	151294678	+	NC_000006/03.03.2008	GGCAAGTACCTGGGCACAGGGGCTGCTTCATGGCCCTTGGACCTGGA CAGTGGA
7	rs9982601	T	21	SLC5A3, MIRPS6	20798690	+	AC_000064/03.03.2008	ACATCTGCCCTCTCTAGACTATAAACTCTTTGGGGCTAGGCTCTTCTTT GTCCT
8	rs12526453	C	6	PHACTR1	14155621 197498571	+	AC_000049/03.03.2008	GCTATCATTTAAATTTGGTTGAGACACAATATGCTGTTGCACTTTCTA TAAA
9	rs6725687	C	2		1 13654703	+	AC_000045/03.03.2008	CTGTGCTGCTTGGTGCCTCTCTGATATGAATACACTGACACCGTCAAA GTAAC
10	rs9818870	T	3	MRAS	1	+	AC_000046/03.03.2008	AGATCACACTGCTTTGCCGTCATTGAACCTCGCAACCTAACTGCTGA GTGAGGACACGTCC (SEQ ID NO:12)
12	rs17228212	C	15	SMAD3				

En cuanto a la variante 4 anterior, esta podría analizarse también buscando rs1746048 que está en desequilibrio de unión a la misma (alelo de riesgo: T), "variante 4a".

En cuanto a la variante 6 anterior, esta podría analizarse también buscando rs1474787 que está en desequilibrio de unión a la misma (alelo de riesgo: G), "variante 6a".

En cuanto a la variante 7 anterior, esta podría analizarse también buscando rs9978407 que está en desequilibrio de unión a la misma (alelo de riesgo: G), "variante 7a".

Secuencia que comprende los polimorfismos:

Variante 4a: GAAGGTTAAAGGGTGGTAGGATTGAGTGAGICAGGCCAGAAACCCTTAGTTA (SEQ ID NO: 13)

Variante 6a: AGGACAATGCTCACCCCTTTGCACCGCTATCACATCACCTGTTCAAGGCAC (SEQ ID NO: 14)

Variante 7a: TACAGGATTCAACAATTAGTCAAAAAGTCTATGAGCTAACAAAATAGGAGCTT (SEQ ID NO: 15)

- El término “determinar si un sujeto tiene un riesgo alterado”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la evaluación de la probabilidad según la cual un sujeto va a padecer una enfermedad. El término “determinar la respuesta a una terapia cardiovascular”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la evaluación de la probabilidad de que un sujeto vaya a responder a una terapia. Tal como entenderán los expertos en la técnica, dicha evaluación, aunque se preferiría que fuera correcta, habitualmente puede no serlo para el 100 % de los sujetos que van a diagnosticarse o evaluarse. Sin embargo, el término requiere que pueda identificarse una parte estadísticamente significativa de sujetos como que tienen un riesgo aumentado o como que responden a la terapia. Si una parte es estadísticamente significativa, puede determinarse sin más preámbulos 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. Intervalos de confianza preferidos son 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, 0,2, 0,1 ó 0,05.
- 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 que están asociadas a los sistemas cardiopulmonar y circulatorio incluyendo pero sin limitarse a isquemia, angina de pecho, estados edematosos, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, oxidación de LDL, adhesión de monocitos a células endoteliales, formación de células espumosas, desarrollo de estría grasa, adherencia y agregación de plaquetas, proliferación de células de músculo liso, lesión por reperfusión, hipertensión arterial, enfermedad trombótica, arritmia (auricular o ventricular o ambas); alteraciones del ritmo cardíaco; isquemia de miocardio; infarto de miocardio; aneurisma cardíaco o vascular; vasculitis, accidente cerebrovascular; arteriopatía obstructiva periférica de una extremidad, un órgano o un tejido; lesión por reperfusión tras isquemia del cerebro, el corazón u otro órgano o tejido, choque endotóxico, quirúrgico o traumático; hipertensión, valvulopatía, insuficiencia cardíaca, tensión arterial anómala; choque; vasoconstricción (incluyendo la asociada a migrañas); anomalía vascular, inflamación, insuficiencia limitada a un único órgano o tejido.
- En una realización preferida, 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 cardiaca congestiva, aneurisma aórtico o una combinación de los mismos.
- El término “terapia cardiovascular”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de tratamiento que da como resultado la mejora o reduce el riesgo de padecer cualquiera de las enfermedades cardiovasculares mencionadas anteriormente. Las terapias adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes trombolíticos, antitrombóticos, agentes antiarrítmicos, agentes que prolongan la repolarización, agentes antihipertensores, vasodilatadores, antihipertensores, diuréticos, agentes ionotrópicos, agentes antianginosos y similares.
- Los ejemplos no limitativos de anticoagulantes incluyen acenocumarol, ancrod, anisindiona, bromindiona, clorindiona, cumetarol, ciclocumarol, sulfato sódico de dextrano, dicumarol, difenadiona, biscumacetato de etilo, etilidencumarol, fluindiona, heparina, hirudina, liapolato sódico, oxazidiona, polisulfato de pentosano, fenindiona, fenprocumón, fosvitina, picotamida, tiocloमारol y warfarina.
- Los ejemplos no limitativos de agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, un dextrano, dipiridamol (Persantin), heparina, sulfipiranona (Anturane), clopidrogel y ticlopidina (Ticlid). Los ejemplos no limitativos de agentes trombolíticos incluyen activador de plasminógeno tisular (Activase), plasmina, pro-urocinasa, urocinasa (Abbokinase) estreptocinasa (Streptase), anistreplasa/APSAC (Eminase).
- En determinadas realizaciones en las que un paciente está padeciendo una hemorragia o tiene una posibilidad aumentada de padecer hemorragia, puede usarse un agente que puede potenciar la coagulación sanguínea. Los ejemplos no limitativos de agentes que promueven la coagulación sanguínea incluyen antagonistas de agentes trombolíticos y antagonistas de anticoagulantes. Los ejemplos no limitativos de antagonistas de anticoagulantes incluyen protamina y vitamina K1.
- Los ejemplos no limitativos de antagonistas de agentes trombolíticos incluyen ácido aminocaproico (Amicar) y ácido tranexámico (Amstat). Los ejemplos no limitativos de antitrombóticos incluyen anagrelida, argatrobán, cilstazol, daltrobán, defibrotida, enoxaparina, fraxiparina, indobufeno, lamoparán, ozagrel, picotamida, plafibrida, tedelparina, ticlopidina y triflusal.
- Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos incluyen agentes antiarrítmicos de clase I (bloqueantes de los canales de sodio), agentes antiarrítmicos de clase II (bloqueantes beta-adrenérgicos), agentes antiarrítmicos de clase III (fármacos que prolongan la repolarización), agentes antiarrítmicos de clase IV (bloqueantes de los canales de calcio) y agentes antiarrítmicos diversos.
- Los ejemplos no limitativos de bloqueantes de los canales de sodio incluyen agentes antiarrítmicos de clase IA, clase IB y clase IC. Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IA incluyen dispiramida (Norpace),

procainamida (Pronestil) y quinidina (Quinidex). Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IB incluyen lidocaína (Xylocaine), tocainida (Tonocard) y mexiletina (Mexitil). Los ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IC incluyen encainida (Enkaid) y flecainida (Tambacor).

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

Los ejemplos no limitativos de agentes con capacidades hipolipemiantes incluyen, sin limitación, secuestrantes de ácidos biliares tales como aminas cuaternarias (por ejemplo colestiramina y colestipol); ácido nicotínico y sus derivados; inhibidores de HMG-CoA reductasa tales como mevastatina, pravastatina y simvastatina; gemfibrozilo y otros ácidos fibrícos, tales como clofibrato, fenofibrato, benzafibrato y cipofibrato; probucol; raloxifeno y sus derivados.

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

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

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

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

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

Los ejemplos no limitativos de agentes anti-angiotensina II incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas del receptor de angiotensina II. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de la ACE) incluyen alacepril, enalapril (Vasotec), captopril, cilazapril, delapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril y ramipril. Los ejemplos no limitativos de bloqueantes del receptor de angiotensina II, también conocidos como antagonistas del receptor de angiotensina II, bloqueantes del receptor de ANG o bloqueantes del receptor de ANG-II tipo 1 (ARBS), incluyen angiocandesartán, eprosartán, irbesartán, losartán y valsartán. Los ejemplos no limitativos de simpaticolíticos incluyen simpaticolíticos de acción central o simpaticolíticos de acción periférica. Los ejemplos no limitativos de simpaticolíticos de acción central, también conocidos como simpaticolíticos del sistema nervioso central (SNC), incluyen clonidina (Catapres), guanabenz (Wytensin), guanfacina (Tenex) y metildopa (Aldomet). Los ejemplos no limitativos de un simpaticolítico de acción periférica incluyen agentes bloqueantes ganglionares, un agente bloqueante de neuronas adrenérgicas, un agente bloqueante beta-adrenérgico o un agente bloqueante alfa-adrenérgico. Los ejemplos no limitativos de agentes bloqueantes ganglionares incluyen mecamilamina (Inversine) y trimetafán (Arfonad). Los ejemplos no limitativos de agentes bloqueantes de neuronas adrenérgicas incluyen guanetidina (Ismelin) y reserpina (Serpasil).

Los ejemplos no limitativos de bloqueantes beta-adrenérgicos incluyen acenitolol (Sectral), atenolol (Tenormin), betaxolol (Kerlone), carteolol (Cartrol), labetalol (Normodyne, Trandate), metoprolol (Lopressor), nadanol (Corgard), penbutolol (Levatol), pindolol (Visken), propranolol (Inderal) y timolol (Blocadren). Los ejemplos no limitativos de bloqueantes alfa-adrenérgicos incluyen prazosina (Minipress), doxazosina (Cardura) y terazosina (Hytrin).

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

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

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

30 En determinadas realizaciones, un antihipertensor puede comprender un derivado de ariletanolamina, un derivado de benzotiadiazina, un derivado de 7V-carboxialquil(péptido/lactama), un derivado de dihidropiridina, un derivado de guanidina, hidracina/ftalazina, un derivado de imidazol, un compuesto de amonio cuaternario, un derivado de reserpina o un derivado de sulfonamida. Los ejemplos no limitativos de derivados de ariletanolamina incluyen amosulalol, bufuralol, dilevalol, labetalol, pronetalol, sotalol y sulfinalol. Los ejemplos no limitativos de derivados de benzotiadiazina incluyen altizida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, ciclotiazida, diazóxido, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetizida, meticloiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclormetiazida y triclorometiazida. Los ejemplos no limitativos de derivados de N-carboxialquil(péptido/lactama) incluyen alacepril, captopril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilato, fosinopril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril y ramipril. Los ejemplos no limitativos de derivados de dihidropiridina incluyen amlodipino, felodipino, isradipino, nifedipino, nilvadipino, nisoldipino y nitrendipino. Los ejemplos no limitativos de derivados de guanidina incluyen betanidina, debrisoquina, guanabenz, guanacina, guanadrel, guanazodina, guanetidina, guanfacina, guanoclor, guanoxabenz y guanoxano. 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.

45 Los ejemplos no limitativos de derivados de reserpina incluyen bietaserpina, deserpidina, rescinamina, reserpina y sirotingopina. Los ejemplos no limitativos de derivados de sulfonamida incluyen ambusida, clopamida, furosemida, indapamida, quinetazona, tripamida y xipamida. Generalmente se usan vasopresores para aumentar la tensión arterial durante un choque, lo que puede producirse durante un procedimiento quirúrgico. Los ejemplos no limitativos de un vasopresor, también conocido como un antihipotensor, incluyen metilsulfato de amezinio, amida de angiotensina, dimetofrina, dopamina, etilefrina, gepefrina, metaraminol, midodrina, norepinefrina, foleodrina y sinefrina. Los ejemplos no limitativos de agentes para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen agentes anti-angiotensina II, tratamiento de reducción de poscarga-precarga, agentes diuréticos e ionotrópicos.

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

60 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, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticloiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclorometiazida, triclorometiazida), un organomercurial (por ejemplo, clormerodrino, meralurida, mercamfamida, mercaptomerina sódica, ácido mercumalílico, mercumatilina sódica, cloruro de mercurio, mersalilo), una pteridina (por ejemplo, furtereno, furtereno), purinas (por ejemplo, acefilina, 7-morfoilinoetilteofilina, pamobrom, proteobromina, teobromina), esteroides incluyendo antagonistas de aldosterona (por ejemplo, canrenona, oleandrina, espirolactona), un derivado de sulfonamida (por ejemplo,

acetazolamida, ambusida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloraminofenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, difenilmetano-4,4'-disulfonamida, disulfamida, etoxzolamida, furosemida, indapamida, mefrusida, metazolamida, piretanida, quinetazona, torasemida, tripamida, xipamida), un uracilo (por ejemplo, aminometradina, amisometradina), un antagonista ahorrador de potasio (por ejemplo, amilorida, triamtereno) o un diurético diverso tal como aminosina, arbutina, clorazanilo, ácido etacrínico, etozolina, hidracarbazina, isosorbida, manitol, metochalcona, muzolimina, perhexilina, ticrinafeno y urea.

Los ejemplos no limitativos de agentes ionotrópicos positivos, también conocidos como cardiotónicos, incluyen 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 lantósido, metamivam, milrinona, nerifolina, oleandrina, ouabaína, oxifedrina, prenalterol, proscillaridina, resibufogenina, escilareno, escilarenina, estrofantina, sulmazol, teobromina y xamoterol.

En realizaciones particulares, un agente ionotrópico es un glucósido cardíaco, agonista beta-adrenérgico o un inhibidor de fosfodiesterasa. Los ejemplos no limitativos de glucósidos cardíacos incluyen digoxina (lanoxina) y digitoxina (crisodigina). Los ejemplos no limitativos de agonistas beta-adrenérgicos incluyen albuterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clenbuterol, clorprenalina, denopamina, dioxetodrina, dobutamina (Dobutrex), dopamina (Intropin), dopexamina, efedrina, etafedrina, epinorepinefrina, fenoterol, formoterol, hexoprenalina, ibopamina, isoetarina, isoproterenol, mabuterol, metaproterenol, metoxifenamina, oxifedrina, pirbuterol, procaterol, protoquilol, reproterol, rimiterol, ritodrina, soterenol, terbutalina, tretoquinol, tulobuterol y xamoterol. Los ejemplos no limitativos de un inhibidor de fosfodiesterasa incluyen amrinona (Incor).

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

El término "muestra", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra procedente de una fuente biológica e incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos, material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos de los mismos, y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

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

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

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

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

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

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la presencia o ausencia de los SNP se identifica mediante la amplificación o la imposibilidad de amplificar un producto de amplificación a partir de la muestra. Las amplificaciones de polinucleótidos normalmente son dependientes del molde. Tales amplificaciones se basan generalmente en la existencia de una cadena de molde para obtener copias adicionales del molde. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos que son capaces de cebar la síntesis del ácido nucleico en formación en un procedimiento dependiente de molde, que se hibrida con la cadena de molde. Normalmente, los cebadores tienen de diez a treinta pares de bases de longitud, pero pueden emplearse secuencias más largas. Los cebadores pueden proporcionarse en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque generalmente se prefiere la forma monocatenaria. Con frecuencia, los pares de cebadores se diseñan para hibridarse selectivamente con regiones distintas de un ácido nucleico de molde, y se ponen en contacto con el ADN de molde en condiciones que permiten la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, pueden seleccionarse condiciones de hibridación de alta rigurosidad que sólo permitirán la hibridación con secuencias que son completamente complementarias con los cebadores. En otras realizaciones, la hibridación puede producirse en rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más apareamientos erróneos con las secuencias de cebador. Una vez hibridado, el complejo molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también denominadas "ciclos," hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

Reacción en cadena de la polimerasa

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

El producto de amplificación puede digerirse con una enzima de restricción antes del análisis. Todavía en otras

realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la presencia o ausencia del SNP se identifica hibridando la muestra de ácido nucleico con un cebador marcado con un resto detectable. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el resto detectable se detecta en un ensayo enzimático, radioensayo, inmunoensayo o mediante detección de fluorescencia. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el cebador se marca con un colorante detectable (por ejemplo, SYBR Green I, YO-PRO-I, naranja de tiazol, Hex, PicoGreen, Edans, fluoresceína, FAM o TET). En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, los cebadores se ubican en un chip. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, los cebadores para amplificación son específicos para dichos SNP.

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

Amplificación isotérmica

Un método de amplificación isotérmica, en el que se usan endonucleasas de restricción y ligasas para lograr la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[[alfa]-tio]-trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención. En una realización, se usa el método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la tipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Amplificación por desplazamiento de cadena

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

Amplificación basada en la transcripción

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

Pueden usarse otros métodos de amplificación según la presente invención. En una realización, se usan cebadores "modificados" en una síntesis dependiente de molde y enzimas de forma similar a la PCR. Los cebadores pueden modificarse mediante marcaje con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto detector (por ejemplo, una enzima). En presencia de una secuencia diana, la sonda se une y se escinde catalíticamente. Tras la escisión, la secuencia diana se libera intacta para unirse mediante la sonda sobrante. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana. En otro enfoque, un procedimiento de amplificación de ácido nucleico implica sintetizar de manera cíclica ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc) que pueden usarse según la presente invención. El ARNmc es un primer molde para un primer oligonucleótido de cebador, que se extiende mediante transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). Entonces se retira el ARN del dúplex ADN:ARN resultante mediante la acción de la ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica para ARN en dúplex o bien con ADN o bien con ARN). El ADNmc resultante es un segundo molde para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (ejemplificado mediante ARN polimerasa de T7) en 5' por su homología con el molde. Este cebador se extiende entonces mediante ADN polimerasa (ejemplificada mediante el fragmento "Klenow" grande de una ADN polimerasa I de *E. coli*), que da como resultado una molécula de ADN bicatenario ("ADNbc"), que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los

cebadores y que tiene adicionalmente, en un extremo, una secuencia de promotor. Esta secuencia de promotor puede usarse por la ARN polimerasa apropiada para obtener muchas copias de ARN del ADN. Estas copias pueden volver a entrar entonces en el ciclo lo que conduce a una amplificación muy rápida. Con la elección apropiada de enzimas, esta amplificación puede realizarse de manera isotérmica sin la adición de enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este procedimiento, puede elegirse que la secuencia de partida esté en forma o bien de ADN o bien de ARN.

Métodos para la separación de ácidos nucleicos

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

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

Para la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden definirse mediante la concentración de sal y mediante la temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad de lavado puede aumentarse disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente de menos de aproximadamente 30 mM de NaCl y 3 mM de citrato de trisodio, y lo más preferiblemente de menos de aproximadamente 15 mM de NaCl y 1,5 mM de citrato de trisodio. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado normalmente incluirán una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42 °C e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68 °C. En una realización preferida, las etapas de lavado se producirán a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato de trisodio 3 mM y SDS al 0,1 %. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1 %. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1 %. Variaciones adicionales en estas condiciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de hibridación y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel *et al.* (Actual Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, 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 métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que muestre identidad sustancial como para poder hibridarse específicamente con los

ácidos nucleicos diana. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con una secuencia endógena normalmente son capaces de hibridarse con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Mediante "sustancialmente idéntica" quiere decirse una molécula de polipéptido o ácido nucleico que muestra una identidad de al menos el 50 % con respecto a una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico de referencia. Preferiblemente, una secuencia de este tipo es idéntica en al menos el 60 %, más preferiblemente el 80 % o el 85 %, y más preferiblemente el 90 %, el 95 % o incluso el 99 % a nivel de aminoácidos o de ácidos nucleicos a la secuencia usada para la comparación. La identidad de secuencia normalmente se mide usando software de análisis de secuencias (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Un software de este tipo empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad de entre e^{-3} y e^{-100} lo que indica una secuencia estrechamente relacionada.

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

La expresión "riesgo aumentado de padecer una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso" se entiende que muestra una propensión de padecer una enfermedad de este tipo mayor 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 un número aumentado de agentes terapéuticos para lograr un efecto terapéutico dado. Las terapias cardiovasculares adecuadas que van a aplicarse a los sujetos seleccionados según el método de la presente invención se han descrito en detalle anteriormente.

Método 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 método (en lo sucesivo el segundo método 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 de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, 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 C en SEQ ID NO: 12 es indicativa de necesitar terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o de necesitar tratamiento cardiovascular profiláctico. Es indicativa de tener una respuesta disminuida a una terapia cardiovascular o de necesitar terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o de necesitar terapia cardiovascular profiláctica.

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

Mediante "terapia cardiovascular temprana y agresiva" quiere decirse un enfoque de tratamiento que tiene como objetivo 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 del metabolismo lipídico, control de pérdida de peso y cese de tabaquismo.

Tal como se describió anteriormente, las composiciones o métodos específicos usados para detectar polimorfismos (por ejemplo, SNPS, RFLP) no son significativos. La invención emplea prácticamente cualquier método para detectar una variación alélica que se conoce en la técnica.

La clave en la determinación del riesgo y la selección del tratamiento es la identificación del 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 asocia a otros factores de importancia clínica para la salud cardiovascular. Tales factores incluyen edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, estado de tabaquismo, antecedentes de consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, antecedentes de ejercicio, dieta, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, nivel de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) o a lipoproteínas de alta densidad (HDL) (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, antecedentes de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal o hipertrofia ventricular izquierda. Por tanto, en otro aspecto, los métodos primero y segundo de la invención pueden incluir además la determinación de factores de riesgo clásicos.

Los factores de riesgo clásicos adecuados para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, sin

limitación, edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, estado de tabaquismo, antecedentes de consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, antecedentes de ejercicio, dieta, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, nivel de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) o a lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, antecedentes 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 tales como, pero sin limitarse a, los modelos REGICOR y SCORE, PROCAM o QRIESGO. 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 estado de tabaquismo. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo REGICOR incluyen edad, sexo, colesterol, colesterol-HDL, tensión arterial sistólica, estado diabético y estado de tabaquismo. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo SCORE incluyen edad, colesterol, tensión arterial sistólica y estado de tabaquismo. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo PROCAM incluyen edad, sexo, colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicéridos, tensión arterial sistólica, estado diabético, estado de tabaquismo, antecedentes familiares de infarto de miocardio. Los factores de riesgo clásicos usados en el modelo QRIESGO incluyen edad, proporción de colesterol total/colesterol-HDL, índice de masa corporal, antecedentes familiares de CVD prematura, estado de tabaquismo, puntuación de Townsend de área de salida, tensión arterial sistólica, tratamiento para hipertensión e interacción con tratamiento de SBP*HTN.

La invención puede emplear métricas (por ejemplo, métodos matemáticos) para evaluar si existe una relación entre información genética y riesgo de resultado cardiovascular adverso. La exactitud predictiva de tales métodos se mejora generalmente cuando se considera el efecto de uno o más de otros factores sobre el pronóstico cardiovascular. Puede usarse un método matemático de métrica, por ejemplo, para correlacionar una enfermedad cardiovascular o la probabilidad de propensión para 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 una 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 alelo variante y una enfermedad cardiovascular o acontecimiento cardiovascular adverso.

Métodos médicos personalizados de la invención

La firma de SNP identificada por 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 método 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 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.

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 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.

Otro objeto de la presente memoria descriptiva es proporcionar una terapia cardiovascular para su uso en 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 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.

Las expresiones "terapia cardiovascular" y "enfermedad cardiovascular" se han explicado en detalle anteriormente. En una realización preferida, la terapia cardiovascular es una terapia con beta-bloqueante o terapia con verapamilo. Aún en otra realización, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma aórtico o una combinación de los mismos.

Los agentes que forman la terapia cardiovascular pueden administrarse a los humanos y otros animales mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo vía oral, vía nasal, como mediante, por ejemplo, un aerosol,

vía rectal, vía intravaginal, vía parenteral, vía intracisternal y vía tópica, como mediante polvos, pomadas o gotas, incluyendo por vía bucal y sublingual. Los niveles de dosificación reales del uno o más agentes administrados en los métodos de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea 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 el modo de administración. Además, la cantidad eficaz puede variar dependiendo de una variedad de factores que incluyen el tamaño, la edad y el sexo del individuo que esté tratándose. Adicionalmente, la gravedad del estado que esté tratándose, así como la presencia o ausencia de otros componentes para el régimen de tratamiento individual influirán en la dosificación real. La cantidad o nivel de dosificación eficaz dependerá de una variedad de factores incluyendo 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 estén empleándose, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con los agentes particulares empleados, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y antecedentes médicos anteriores del animal, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

El método médico personalizado de la invención también puede incluir la determinación de factores de riesgo clásicos tales como edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, estado de tabaquismo, nivel de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) o a lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, antecedentes de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal, o hipertrofia ventricular izquierda, antecedentes de consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, antecedentes de ejercicio, dieta y antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular; y la correlación de la presencia del SNP y uno o más factores de riesgo de enfermedad cardiovascular con necesidad de una terapia cardiovascular personalizada, posiblemente temprana y/o agresiva, donde una correlación positiva identifica que el sujeto tiene un riesgo alterado, en particular aumentado, de una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso. En una realización, el método implica además seleccionar un régimen de tratamiento apropiado. En otra realización, el método implica además administrar el régimen tratamiento al sujeto.

Métodos para determinar el riesgo cardiovascular en un sujeto

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

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

en la que,

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

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

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

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

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

exp: exponenciación natural.

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

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

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

10 $CRF_{p,i}$: valor de cada factor de riesgo coronario “p” incluido en la ecuación para un individuo “i”.

$$\bullet \sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * SNP_{j,i} \text{ donde}$$

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

15 β_{SNP_j} logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a la variante genética “j”. El posible intervalo de valores de β para cada variante genética “j” se muestra en la tabla B.

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

20 $\overline{CRF_p}$: valor promedio para el factor de riesgo clásico “p” en la población. Este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional.

25 $\overline{SNP_j}$: número de copias de alelo de riesgo promedio para la variante genética “j” en la población. Este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional.

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

	CRF_p	β_{CRF_p} para hombres	β_{CRF_p} para mujeres	$\overline{CRF_p}$
FRAMINGHAM (original o adaptación)	Edad	0,048	0,338	35-74
	Edad ²	0	-0,003	
	Colesterol total (mg/dl)			
	<160	-0,659	-0,261	0-30
	160 - <200	0	0	0-30
	200 - <240	0,177	0,208	0-30
	240 - <280	0,505	0,244	0-30
	≥280	0,657	0,53	0-30
	Colesterol-HDL (mg/dl)			
	<35	0,497	0,843	0-30
	35 - <45	0,243	0,378	0-30
	45 - <50	0	0,198	0-30
	50 - <60	-0,051	0	0-30
	≥60	-0,487	-0,430	0-30
	Tensión arterial			
	Óptima	-0,002	-0,534	0-30
	Normal	0	0	0-30
	Límite alto	0,283	-0,068	0-30

	Hipertensión I	0,522	0,263	0-30
	Hipertensión II	0,619	0,466	0-30
	Diabetes	0,428	0,597	0-30
	Tabaquismo	0,523	0,292	0-60
PROCAM	Edad	0,103	-	35-74
	Colesterol-LDL (mg/dl)	0,013	-	100-250
	Colesterol-HDL (mg/dl)	-0,032	-	35-65
	Triglicéridos (mg/dl)	0,317	-	100-200
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,010	-	100-160
	Antecedentes familiares de MI	0,382	-	1-45
	Diabetes	0,399	-	0-30
QRISK	Log(edad/10)	4,474	3,925	35-74
	Colesterol total/col.-HDL	0,001	0,001	2-10
	Índice de masa corporal (kg/m ²)	0,015	0,022	22-32
	Antecedentes familiares de CVD prematura	0,206	0,262	1-45
	Tabaquismo	0,425	0,349	0-60
	Puntuación de Townsend de área de salida	0,034	0,017	-3-3
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,005	0,004	100-160
	Tratamiento para la hipertensión	0,550	0,614	0-40
	Interacción con tratamiento de SBP*HTN	-0,004	-0,007	---
	Supervivencia media \hat{S}	0,951 (0,01-9,00)	0,978 (0,01-9,00)	

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

5

SNP _j	β_{SNP_j}	$\overline{SNP_j}$
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

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

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

en la que

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

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

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

15 GSQ_{q,i}: 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 a nivel de población para un individuo “i”. Las variantes incluidas actualmente en el modelo se muestran en la tabla D.

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

exp: exponenciación natural.

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

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

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

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

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

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

35 β_{GSQ_q} : logaritmo de la razón de riesgo que corresponde a diferentes quintiles de puntuación genética (GSQ) “q”. El posible intervalo de valores de β para cada quintil “q” se muestra en la tabla D.

40 GSQ_{q,i}: 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 a 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.

45 $\overline{\text{GSQ}_q}$: valores de desde 1 hasta 5 de los diferentes quintiles para el quintil de puntuación genética “q” en la población.

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

	CRFP	β_{CRFP} para hombres	β_{CRFP} para mujeres	$\overline{\text{CRFP}}$
FRAMINGHAM (original o adaptación)	Edad	0,048	0,338	35-74
	Edad2	0	-0,003	
	Colesterol total (mg/dl)			
	<160	-0,659	-0,261	0-30
	160 - <200	0	0	0-30
	200 - <240	0,177	0,208	0-30
	240 - <280	0,505	0,244	0-30
	≥280	0,657	0,53	0-30
	Colesterol-HDL (mg/dl)			
	<35	0,497	0,843	0-30
	35 - <45	0,243	0,378	0-30
	45 - <50	0	0,198	0-30
	50 - <60	-0,051	0	0-30
	≥60	-0,487	-0,430	0-30
	Tensión arterial			
	Óptima	-0,002	-0,534	0-30
	Normal	0	0	0-30
Límite alto	0,283	-0,068	0-30	
Hipertensión I	0,522	0,263	0-30	
Hipertensión II	0,619	0,466	0-30	
Diabetes	0,428	0,597	0-30	
Tabaquismo	0,523	0,292	0-60	
PROCAM	Edad	0,103	-	35-74
	Colesterol-LDL (mg/dl)	0,013	-	100-250
	Colesterol-HDL (mg/dl)	-0,032	-	35-65
	Triglicéridos (mg/dl)	0,317	-	100-200
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,010	-	100-160
	Antecedentes familiares de MI	0,382	-	1-45
	Diabetes	0,399	-	0-30
QRISK	Log(edad/10)	4,474	3,925	35-74
	Colesterol total/Col.-HDL	0,001	0,001	2-10
	Índice de masa corporal (kg/m ²)	0,015	0,022	22-32
	Antecedentes familiares de CVD prematura	0,206	0,262	1-45
	Tabaquismo	0,425	0,349	0-60
	Puntuación de Townsend de área de salida	0,034	0,017	-3-3
	Tensión arterial sistólica (mmHg)	0,005	0,004	100-160
	Tratamiento para la hipertensión	0,550	0,614	0-40
	Interacción con tratamiento de SBP*HTN	-0,004	-0,007	---
	Supervivencia media \hat{S}	0,951 (0,01-9,00)	0,978 (0,01-9,00)	

Tabla D. Definición de quintiles de puntuación genética (GSQq) según el número de alelos de riesgo y logaritmo de razón de riesgo (intervalo de posibles valores), β_{GSQq} , para los quintiles de puntuación genética.

GSGIq	β_{GSGIq}
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)

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

Función 1c

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

Primera etapa: calcular la combinación lineal de factores de riesgo

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

15 donde

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

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

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

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

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

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

$$30 \sum_{j=1}^J \beta_{SNP_j} * (SNP_{i,j} - \overline{SNP}_{i,j})$$

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

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

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

40 \overline{SNP}_j : número de copias de alelo de riesgo promedio para la variante genética "j" en la población. Este valor promedio se adaptará a la prevalencia regional o nacional.

Segunda etapa: calcular la supervivencia de nivel inicial.

$$45 S_0(\text{edad}) = \exp\{-\exp(\alpha) * (\text{edad} - 20)^p\}$$

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

50 donde

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

exp: exponenciación natural

Tercera etapa: calcular la supervivencia en 10 años

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

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

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

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

15 $Riesgo_{10}(\text{edad}) = 1 - S_{10}(\text{edad})$

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

20 $CVD_{Riesgo_{10}} = [CHDR_{Riesgo_{10}}(\text{edad})] + [No-CHDR_{Riesgo_{10}}(\text{edad})]$

Tabla E

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

CHD: cardiopatía coronaria

CVD: enfermedad cardiovascular

Tabla F

25

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

CHD: cardiopatía coronaria

CVD: enfermedad cardiovascular

Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluidos en la presente invención y expuestos en la tabla 1 y usando las funciones descritas en las funciones 1a a 1d anteriormente han demostrado obtener una validez mayor y una validación superior en la predicción de CVD y/o complicaciones de CVD que las obtenidas usando los factores de riesgo clásicos solos y usando las funciones en uso hoy en día o funciones publicadas incluyendo información genética. Además, también se mejoró la reclasificación.

Medios implementados por ordenador

Otro objeto de la presente memoria descriptiva es proporcionar un programa informático o medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención. La implementación por ordenador puede lograrse usando un programa informático que proporciona instrucciones de forma legible por ordenador. El ordenador recogería los datos, analizaría los datos según los métodos descritos en el presente documento, y entonces proporcionaría un resultado del análisis. Por tanto, en otra realización, la memoria descriptiva se refiere a un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo un método de la invención.

Pueden usarse diferentes tipos de lenguajes informáticos para proporcionar instrucciones de forma legible por ordenador. Por ejemplo, el programa informático puede escribirse usando lenguajes tales como C, C++, Microsoft C#, Microsoft Visual Basic, FORTRAN, PERL, HTML, JAVA, S, o lenguajes de comandos *shell* UNIX o LINUX tales como la *shell* de C, y diferentes dialectos de tales lenguas. "R," un dialecto del lenguaje S, es un ejemplo de un dialecto con atributos que facilitan análisis como los representados aquí (véase <http://cran.us.r-project.org>).

Pueden usarse diferentes tipos de ordenadores para ejecutar un programa para realizar las técnicas de análisis descritas en el presente documento. Los programa informáticos para realizar las técnicas de análisis descritas en el presente documento pueden ejecutarse en un ordenador que tenga suficiente capacidad de memoria y

procesamiento. Un ejemplo de un ordenador adecuado es uno que tenga un procesador basado en Intel Pentium (g) de 200 MHz o mayor, con 64 MB o más de memoria principal. Sistemas informáticos equivalentes y superiores se conocen bien en la técnica. 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 4 GB RAM dual 866 MHz 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.

Kits de la invención

La invención se refiere además a un kit para determinar la presencia de los marcadores polimórficos usados en los métodos 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 tal como se define en la reivindicación 7.

Un experto en la técnica reconocerá que, basándose en los SNP y la información de las secuencias asociadas divulgados en el presente documento, pueden desarrollarse reactivos de detección y usarse para someter a ensayo cualquier SNP de la presente invención individualmente o en combinación, y tales reactivos de detección pueden incorporarse fácilmente a uno de los formatos de kit o sistema 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 los 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, recipientes, envases tales como el envasado destinado para escala comercial, sustratos a los que se unen los reactivos de detección de SNP, componentes de hardware electrónico, etc.). Por consiguiente, la presente invención proporciona además kits y sistemas de detección de SNP, incluyendo pero sin limitarse a, conjuntos envasados de sonda y cebador (por ejemplo, conjuntos de sonda/cebador 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 electrónico; por ejemplo, las matrices (“chips de ADN”) y sistemas microfluídicos (sistemas “laboratorio en un chip”) proporcionados por diversos fabricantes normalmente comprenden componentes de hardware. Otros kits/sistemas (por ejemplo, conjuntos de sonda/cebador) pueden no incluir componentes de hardware electrónico, pero pueden componerse de, por ejemplo, uno o más reactivos de detección de SNP (junto con, opcionalmente, otros reactivos bioquímicos) envasados en uno o más recipientes.

En algunas realizaciones, un kit de detección de SNP normalmente contiene 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 desoxinucleótidos trifosfato 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 una 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 una realización preferida de la presente invención, los kits/sistemas de detección de SNP están en forma de una matriz de ácido nucleico, o kits compartimentalizados, incluyendo sistemas microfluídicos/*de laboratorio en un chip*.

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 objetivo. Pueden incluirse múltiples pares de sondas específicas de alelo en el kit/sistema para evaluar simultáneamente grandes números de SNP, siendo al menos uno de ellos un SNP de la presente invención. En algunos kits/sistemas, las sondas específicas de alelo se inmovilizan en un sustrato tal como una matriz o perla. Por ejemplo, el mismo sustrato puede comprender sondas específicas de alelo detectar al menos 1; 10; 100; 1000; 10.000; 100.000; 500.000 (o cualquier otro número entre ellos) o sustancialmente todos los SNP divulgados en el presente documento.

Preferiblemente, el kit comprende varios oligonucleótidos que se hibridan específicamente con las secuencias de ácido nucleico definidas en la tabla 1 o con secuencias que flanquean dichas regiones. Estos oligonucleótidos

5 permitirán la amplificación específica del polinucleótido en el que va a evaluarse la posición polimórfica a partir de un molde de ADN o ADNc genómico humano, usando PCR. Lo más preferiblemente, estos oligonucleótidos también permitirán el genotipado específico de estos sitios polimórficos actuando como cebadores, sondas, o sustratos de ligamiento que permiten la diferenciación de alelos polimórficos. Alternativamente, estos oligonucleótidos pueden ser adecuados para su uso en métodos que no dependen de una amplificación previa del ADN de partida, tal como ensayos Invader y métodos de detección basados en ligamiento. Preferiblemente, los oligonucleótidos u otros componentes del kit incluirán un marcador detectable, por ejemplo, un marcador fluorescente, marcador enzimático, marcador de dispersión de luz, marcador de masa u otro marcador. Alternativamente, la detección puede lograrse mediante métodos 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 relación o lista de las enfermedades para las que un polimorfismo o polimorfismos particulares de correlaciona con una eficacia y/o seguridad de tratamiento.

15 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, papel, nilón u otro tipo de membrana, filtro, chip o cualquier otro soporte sólido adecuado. Los polinucleótidos pueden sintetizarse directamente sobre el sustrato, o pueden sintetizarse por separado del sustrato y luego fijarse al sustrato. En una realización, la micromatriz se prepara y se usa según los métodos descritos en la 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). En otras realizaciones, tales matrices se producen mediante los métodos descritos por Brown *et al.*, patente estadounidense n.º 5.807.522.

25 Se revisaron matrices de ácido nucleico en las siguientes referencias: Zammattéo *et al.*, “New chips for molecular biology and diagnostics”, Biotechnol Annu Rev. 2002; 8:85-101; Sosnowski *et al.*, “Active microelectronic array system for ADN hybridization, genotyping and pharmacogenomic applications”, Psychiatr Genet. Diciembre de 2002; 12(4): 181-92; Heller, “DNA microarray technology: devices, systems, and applications”, Annu Rev Biomed Eng. 2002; 4: 129-53. Publicación electrónica 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.

35 Puede implementarse cualquier número de sondas, tales como sondas específicas de alelo, en una matriz, y cada sonda o par de sondas puede hibridarse con una posición de SNP diferente. En el caso de las sondas de polinucleótido, pueden sintetizarse en zonas designadas (o sintetizarse por separado y luego fijarse en zonas designadas) sobre un sustrato usando un procedimiento químico dirigido por la luz. Cada chip de ADN puede contener, por ejemplo, de miles a millones de sondas de polinucleótido sintéticas individuales dispuestas en un patrón de tipo cuadrícula y miniaturizarse (por ejemplo, hasta el tamaño de una moneda de diez centavos). Preferiblemente, las sondas se unen a un soporte sólido en una matriz ordenada, dirigible. Una micromatriz puede estar compuesta por un gran número de polinucleótidos únicos, monocatenarios, 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 tienen sólo aproximadamente 7-20 nucleótidos de longitud. En otros tipos de matrices, tales como matrices usadas conjuntamente con tecnología de detección quimioluminiscente, longitudes de sonda preferidas pueden ser, por ejemplo, aproximadamente 15-80 nucleótidos de longitud, preferiblemente aproximadamente 50-70 nucleótidos de longitud, más preferiblemente aproximadamente 55-65 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. La micromatriz o el kit de detección puede contener polinucleótidos que cubren la secuencia 5' o 3' conocida del sitio de SNP diana, polinucleótidos secuenciales que cubren la secuencia de longitud completa de un gen/transcrito; o polinucleótidos únicos seleccionados de zonas particulares a lo largo de la longitud de una secuencia de gen/transcrito diana, particularmente zonas correspondientes a uno o más SNP divulgados en el presente documento. Los polinucleótidos usados en la micromatriz o el 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 polimórfico o para genes/transcritos de interés.

60 Los ensayos de hibridación basados en matrices de polinucleótidos se fundamentan en las diferencias en la estabilidad de hibridación de las sondas con variantes de secuencia diana perfectamente apareadas y desapareadas. Para el genotipado de SNP, generalmente es preferible que las condiciones de rigurosidad usadas en los ensayos de hibridación sean suficientemente altas de manera que puedan diferenciarse las moléculas de ácido nucleico que difieren entre sí en tan solo una única posición de SNP (por ejemplo, los ensayos de hibridación de SNP típicos están diseñados de modo que la hibridación sólo se producirá si un nucleótido particular está presente 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 de alelo para la 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 en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, N.Y. (1989), 6,3.1-6,3.6.

5 En otras realizaciones, las matrices se usan conjuntamente con tecnología de detección quimioluminiscente. Las siguientes patentes y solicitudes de patente, proporcionan información adicional relacionada con la detección quimioluminiscente: solicitudes de patente estadounidense con n.^{os} de serie 10/620.332 y 10/620.333 describen enfoques quimioluminiscentes para la detección de micromatrices; las patentes estadounidenses n.^{os} 6.124.478, 6.107.024, 5994073, 5981768, 5871938, 5843681, 5800999 y 5773628 describen métodos y composiciones de dioxetano para realizar detección quimioluminiscente; y la solicitud publicada estadounidense US2002/0110828
10 divulga métodos y composiciones para controles de micromatrices.

15 En una 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 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 ellos) y conteniendo (o siendo complementario a) un SNP.
20 En algunas realizaciones, el nucleótido complementario al sitio de SNP está comprendido en los 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido(s) del centro de la sonda, más preferiblemente en el centro de dicha sonda.

25 Una sonda de polinucleótido puede sintetizarse 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 (Baldeschweiler *et al.*). En otro aspecto, puede usarse una matriz "cuadrículada" análoga a una inmunotransferencia por puntos (o por ranuras) para disponer y unir fragmentos o oligonucleótidos de ADNc a la superficie de un sustrato usando un sistema de vacío, procedimientos térmicos, UV, de unión mecánica o química. Una matriz, tal como las descritas anteriormente, puede producirse a mano o usando dispositivos (aparato de inmunotransferencia por ranuras o de inmunotransferencia por puntos), materiales (cualquier soporte sólido) y
30 máquinas (incluyendo instrumentos robóticos) disponibles, y puede contener 8, 24, 96, 384, 1536, 6144 o más polinucleótidos, o cualquier otro número que se ajuste al uso eficaz de instrumentación disponible comercialmente.

35 Los usos de los kits según la invención normalmente implican incubar una muestra de ácidos nucleicos de prueba con una matriz que comprende una o más sondas correspondientes a al menos una posición de SNP de la presente invención, y evaluar la unión de un ácido nucleico procedente 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 muchos factores como el formato empleado en el ensayo, los métodos 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
40 cualquiera de los formatos de ensayo de hibridación, amplificación y alineamiento disponibles comúnmente puede adaptarse fácilmente para detectar los SNP divulgados en el presente documento.

45 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 posterior amplificación y/o detección de una molécula de ácido nucleico que contiene SNP. Tales componentes de preparación de muestra pueden usarse para producir extractos de ácido nucleico, incluyendo ADN y/o ARN, procedentes de fluidos biológicos. En una realización preferida de la invención, el fluido corporal es sangre, saliva o frotis bucales. Las muestras de prueba usadas en los métodos descritos anteriormente variarán basándose en factores tales como el formato del ensayo, la naturaleza del método de detección, y los tejidos, células o extractos específicos usados como la muestra de prueba que va a someterse a ensayo. Los métodos de preparación de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para obtener una muestra que es compatible con el sistema utilizado. Aún en 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 a CVD tales como edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, estado de tabaquismo, antecedentes de consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, antecedentes de ejercicio, dieta, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, colesterol total, niveles de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) o a lipoproteínas de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, antecedentes de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal o hipertrofia ventricular
50 izquierda.

60 Otra forma de kit contemplada por la presente invención es un kit compartimentalizado. Un kit compartimentalizado incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en recipientes separados. Tales recipientes incluyen, por ejemplo, pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico, tiras de plástico, vidrio o papel, o material de micromatriz tal como sílice. Tales recipientes permiten que el usuario transfiera eficazmente reactivos de un compartimento a otro compartimento de manera que las muestras de prueba y los reactivos no se contaminen de manera cruzada, o de un recipiente a otro depósito no incluido en el kit, y los agentes o disoluciones de cada
65

recipiente pueden añadirse de una manera cuantitativa de un compartimento a otro o a otro depósito. Tales recipientes pueden incluir, por ejemplo, uno o más recipientes que aceptarán la muestra de prueba, uno o más recipientes 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 recipientes que contienen reactivos de lavado (tales como solución salina tamponada con fosfato, tampones Tris, etc.), y uno o más recipientes que contienen los reactivos usados para revelar la presencia de la sonda unida u otros reactivos de detección de SNP. El kit puede comprender opcionalmente además compartimentos y/o reactivos para, por ejemplo, amplificación de ácidos nucleicos u otras reacciones enzimáticas tales como reacciones de extensión con cebador, hibridación, ligación, 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.* 24 de Feb. de 2003; 55(3):349-77). En tales dispositivos microfluídicos, los recipientes pueden denominarse, por ejemplo, "compartimentos", "cámaras" o "canales" microfluídicos.

Los dispositivos microfluídicos, que también pueden denominarse sistemas de "laboratorio en un chip", sistemas microelectromecánicos biomédicos (bioMEM), o sistemas integrados de múltiples componentes, son kits/ sistemas a modo de ejemplo de la presente invención para analizar SNP. Tales sistemas miniaturizan y compartimentalizan procedimientos tales como reacciones de hibridación de sonda/diana, amplificación de ácidos nucleicos y electroforesis capilar en un solo dispositivo funcional. Tales dispositivos microfluídicos normalmente utilizan 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. Un ejemplo de un sistema microfluídico se divulga en la patente estadounidense n.º 5.589.136, que describe la integración de la amplificación de PCR y la electroforesis capilar en chips. Sistemas microfluídicos a modo de ejemplo comprenden un patrón de microcanales diseñados 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 través diferentes zonas del microchip para crear bombas y válvulas microscópicas funcionales sin partes móviles. Variando el voltaje puede usarse como un medio para controlar el flujo de líquido en intersecciones entre los canales micro-mecanizados y para cambiar la velocidad de flujo del líquido para bombear a través de diferentes secciones del microchip. Véanse, 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 ácidos nucleicos, extensión con cebador, electroforesis capilar y un método de detección tal como detección por fluorescencia inducida por láser.

35 Métodos y kits para la detección de predisposición para 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 a la predisposición a desarrollar los factores de riesgo clásicos de CVD y/o los factores de riesgo clásicos de complicaciones de CVD incluyendo, pero sin limitarse a, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, angina de pecho, accidentes isquémicos transitorios, insuficiencia cardiaca congestiva, aneurisma aórtico y muerte. Los factores de riesgo clásicos de CVD y/o las 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, tabaquismo, hipertensión y trombosis.

Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva tal como se expone en la tabla 2 ha demostrado obtener una capacidad superior para predecir el desarrollo de diabetes mellitus que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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 método para determinar 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 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y expuestos en la tabla 3 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de altos niveles de colesterol total que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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 método para determinar 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 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y expuestos en la tabla 4 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de altos niveles de colesterol-LDL que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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

30 Tabla 4

35 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un método para determinar 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.

40 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y expuestos en la tabla 5 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de bajos niveles de colesterol-HDL que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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	ABCA1	A
rs2230808	ABCA1	A

rs505717	ZNF568	G
rs569371	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

Tabla 5

5 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un método para determinar 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 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y expuestos en la tabla 6 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de altos niveles de triglicéridos que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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.

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

15 Tabla 6

20 Por tanto, en otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a un método para determinar 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 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y expuestos en la tabla 7 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de obesidad que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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.

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
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 método para determinar 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 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y expuestos en la tabla 8 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de tabaquismo que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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 método para determinar si un sujeto tiene un riesgo alterado de desarrollar tabaquismo, 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 tabaquismo.

25 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y expuestos en la tabla 9 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de hipertensión que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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 método para determinar 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 Sorprendentemente, la combinación específica de marcadores de SNP incluidos en la presente memoria descriptiva y tal como se expone en la tabla 10 ha demostrado obtener una mayor capacidad para predecir el desarrollo de trombosis que la obtenida usando los métodos actualmente en uso 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 método para determinar 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 método para estimar la predisposición a desarrollar los factores de riesgo clásicos de CVD y/o los factores de riesgo clásicos de complicaciones de CVD incluyendo, pero sin limitarse a, diabetes mellitus, altos niveles de colesterol total, altos niveles de colesterol-LDL, bajos niveles de colesterol-HDL, altos niveles de triglicéridos, obesidad, tabaquismo, hipertensión y trombosis, que comprende la detección de la presencia de marcadores de SNP expuestos en las tablas de la 2 a la 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 a cada ruta metabólica o factor de riesgo. Cuanto mayor es el número de alelos de riesgo presentes, mayor es el riesgo de desarrollar cada factor de riesgo.

35 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 método o técnica capaz de determinar los nucleótidos presentes en un sitio polimórfico. Es obvio en la técnica que los nucleótidos presentes en los marcadores de SNP pueden determinarse a partir de cada cadena de ácido nucleico o a partir 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 posible muestra que contenga ácido nucleico, preferiblemente sangre, células o subfracciones de células (que son las células aisladas 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 el análisis de los datos y la 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 a tal predisposición.

Ejemplo 1

Diseño del estudio

Este es un estudio de casos y controles con información *in silico* procedente del Wellcome Trust Case Control Consortium (Consortio de casos y controles de Wellcome Trust, WTCCC). Los casos (N=1.988) se seleccionaron de la primera fase de estudio de WTCCC. Tal como se describe en el estudio original, los casos de cardiopatía coronaria presentaron historia de infarto de miocardio o revascularización coronaria (incluyendo revascularización coronaria o angioplastia coronaria) antes de los 66 años de edad. Los controles fueron 2.674 sujetos procedentes de donantes de sangre [Blood Services Controls (NBS) del R.U.], incluidos en el proyecto WTCCC.

Para este ejemplo se analizaron los SNP enumerados en la tabla 1A. Los SNP analizados son: rs 17465637, rs 6725887, rs 9818870, rs 12526453, rs 6922269, rs 1333049, rs 501120 (analizando su LD rs1746048), rs 17228212, y rs 9982601. Para cada una de las variantes se definió un alelo de riesgo, es decir aquel nucleótido que cuando está presente confiere un mayor riesgo de padecer un acontecimiento coronario.

Para calcular la puntuación de riesgo genético, se consideró el número acumulado de alelos de riesgo a partir de esos nueve SNP presente en cada individuo. Para cada una de las variantes estudiadas, cada individuo puede tener 0, 1 ó 2 alelos de riesgo. Habiendo calculado el sumatorio de alelos de riesgo acumulados en el conjunto de las variantes seleccionadas (n=9), para cada individuo se dio una puntuación que podía ir desde 0 hasta 18 (puntuación baja = riesgo bajo, puntuación alta = riesgo alto).

Para considerar el efecto aditivo del conjunto de las diferentes variantes genéticas, primero se analizó la distribución del número acumulado de alelos de riesgo en casos y controles, y se comparó la diferencia del promedio de la puntuación de riesgo genético entre casos y controles por medio de la prueba de la t de Student.

Después, se usó la regresión logística para la estimación de la asociación entre la puntuación de riesgo genético y el riesgo de infarto de miocardio y se realizaron varios análisis:

a) En primer lugar, esta variable de riesgo genético se consideró como variable categórica. Como grupo de referencia se consideró aquel grupo de personas que portaba 7 de los alelos de riesgo, que es el valor más próximo a la mediana en controles por ser el grupo con el mayor número de individuos que permite obtener los estimadores de riesgo más precisos. Se estimó el OR (cociente de probabilidades) para cada categoría de la puntuación de riesgo genético (grupo de portadores de 8 alelos frente a portadores de 7 alelos; portadores de 9 alelos frente a 7; portadores de 6 alelos frente a 7; y así sucesivamente);

b) En segundo lugar, se calculó el OR mediante el aumento del alelo de riesgo tomando esta variable como una variable continua y suponiendo que el riesgo es constante para el aumento del alelo en el intervalo de valores observados y se analizó si la asociación entre el número de alelos y el riesgo de infarto de miocardio era lineal.

c) En tercer lugar, se repitió el análisis explicado en el párrafo a) pero definiendo los grupos basándose en los quintiles de puntuación de riesgo genético obtenidos en el grupo de control y tomando como referencia el primer quintil.

También se analizó si había interacciones entre las variantes genéticas de interés para determinar si el efecto de la combinación de las mismas era superior al aditivo.

Para todos estos análisis, se consideró que un valor de $p < 0,05$ era estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron por medio de programa R.

Resultados

La figura 1 muestra la distribución del número de alelos de riesgo en casos y controles (véase también la tabla 11). Se observa la misma forma de distribución en ambos grupos, sin embargo, hay un desplazamiento hacia la derecha del número de alelos en los casos (media de alelos de riesgo [desviación típica] 7,9 [1,8] en casos y 6,8 [1,8] en

controles, valor de $p=2 \times 10^{-16}$). Para determinar si el aumento de riesgo era constante en los diferentes grupos definidos por el número de alelos, se calculó la magnitud del riesgo para cardiopatía coronaria en cada grupo tomando como referencia el grupo con 7 alelos de riesgo. En la figura 2, se muestran el OR y el coeficiente de regresión (β) para cada grupo con respecto al grupo de referencia, el cambio en el valor del coeficiente de regresión ($\Delta \beta$) entre categorías consecutivas, y el valor de p dado por la prueba exacta de Fisher para diferencias entre casos y controles. La figura 1 muestra una representación gráfica del coeficiente de regresión obtenido (β).

El aumento del riesgo para el aumento del alelo parece ser constante en el intervalo de valores observados. Para cuantificar este aumento por alelo, se consideró el número de alelos variable como una variable continua y se estimó que el OR por incremento del alelo era de 1,18 (intervalo de confianza al 95 %: 1,15-1,22; $p= 2 \times 10^{-16}$); este modelo lineal explica el 92 % de la variabilidad para los valores de β obtenidos.

Cuando estos análisis se realizaron sopesando cada una de las variantes seleccionadas por la magnitud de su efecto individual, los resultados fueron casi idénticos (OR para el aumento de alelo=1,18; intervalo de confianza al 95 %: 1,14-1,21).

No se observó interacción estadísticamente significativa entre las variantes genéticas, un resultado que también apoya un efecto aditivo de las variantes analizadas.

En la figura 3 se muestran los resultados del análisis que define 5 grupos según los quintiles del número de alelos de riesgo y tomando como referencia el quintil con el menor número de alelos. Los incrementos en el riesgo ($\Delta \beta$) entre los quintiles consecutivos son similares (aumento promedio de β : 0,198), y el OR observado entre los extremos es de 2,21 (figura 4).

Conclusión

Se ha verificado que la asociación entre el número de alelos de riesgo y el riesgo de cardiopatía coronaria es lineal y directa, de modo que cuanto mayor es el número de alelos de riesgo, mayor es la probabilidad de presentar cardiopatía coronaria. Esta asociación lineal se ha observado para otros fenotipos como la tensión arterial y la diabetes.

La magnitud de la asociación observada, determinada por el coeficiente de regresión es similar a la observada en algunos factores de riesgo cardiovascular clásicos incluidos en las funciones de riesgo coronario. Por ejemplo, en la función de riesgo de Framingham y sus adaptaciones, la diferencia en hombres entre los coeficientes de regresión de los extremos para el colesterol variable (<160 y ≥ 280 mg/dl) es de 1,32 (lo que correspondería a un OR de 3,74) y para la tensión arterial variable (ideal y grado II-III de hipertensión) es de 0,62 (OR=1,86). En el análisis, la diferencia entre el coeficiente de regresión de las categorías extremas de quintiles del número de alelos es de 0,79, (OR=2,20) similar a los valores de la tensión arterial; y considerando el número de alelos y tomando el grupo de 4 y 12 como extremos de alelos de riesgo, la diferencia en los coeficientes de regresión es de 1,05 (OR=2,86), ligeramente inferior a la del colesterol.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que este tipo de puntuación del riesgo genético para cardiopatía coronaria que se basa en un efecto aditivo de un número de alelos de riesgo en diferentes marcadores genéticos que son independientes de los factores de riesgo cardiovascular clásicos, está asociada a un mayor riesgo de cardiopatía coronaria.

Alelos	Número de controles	Número de caso	OR [IC del 95%]	β	$\Delta\beta$	Valor de p
1	0	1	3,13 [0,04-245,35]	1,141	1,603	4×10^{-01}
2	2	1	0,63 [0,01-5,62]	-0,462	0,192	1×10^{-01}
3	24	8	0,52 [0,21-1,13]	-0,654	-0,298	1×10^{-01}
4	85	38	0,70 [0,47-1,01]	-0,356	-0,042	5×10^{-02}
5	269	127	0,74 [0,58-0,93]	-0,314	-0,231	7×10^{-03}
6	430	254	0,92 [0,77-1,11]	-0,083	-0,083	4×10^{-01}
7	592	379	1	0	0	1
8	550	410	1,16 [0,99-1,37]	0,148	0,148	7×10^{-02}
9	395	389	1,54 [1,30-1,83]	0,432	0,284	5×10^{-07}
10	217	230	1,65 [1,35-2,02]	0,501	0,069	7×10^{-07}
11	80	107	2,09 [1,58-2,76]	0,737	0,236	2×10^{-07}
12	25	32	2,00 [1,22-3,23]	0,693	-0,044	4×10^{-03}
13	4	11	4,30 [1,56-12,41]	1,458	0,765	2×10^{-02}
14	0	1	3,13 [0,04-245,35]	1,141	-0,317	4×10^{-01}

Lista de secuencias

	<110> Gendiag. Exe, SL	
5	<120> Marcadores de riesgo para enfermedad cardiovascular	
	<130> 142093	
	<160> 15	
10	<170> PatentIn versión 3.4	
	<210> 1	
	<211> 52	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
20	tcatactaac catatgatca acagttcaaa agcagccact cgcagaggta ag	52
	<210> 2	
	<211> 52	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
	aaagagaaag aaataggagc aggatcaact tccagatata cagagaatat aa	52
30	<210> 3	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 3	
	aaccataata gttatgctga gaagttcttt tttgcatag tgcaagataa ca	52
	<210> 4	
	<211> 52	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
45	ttgaaaaaaa ttaattctca cactcctaag tgcatttaatt ttaagctact tt	52
	<210> 5	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 5	
	aaaagcaagc acatctgtgg cattaccaac attaaatatt tatatacata gt	52
	<210> 6	
55	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
60	acagttttta ctgtaactgc caataaataa tactcatctt taaaaagaca tc	52
	<210> 7	
	<211> 52	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 627 446 T3

	<400> 7		
	ggcaagtacc tgggcacagg gctgcttcat ggccttggac ctggacagtg ga	52	
5	<210> 8 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 8 acatctgcct ctctagacta taaactcttt ggggctaggt ctctttgtc tt	52	
15	<210> 9 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 9 gctatcattt aaatttggt gagacacaat atgctgttgc actttctata aa	52	
20	<210> 10 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
25	<400> 10 ctgtgctgct tgggctctct ctgatatgaa tacactgaca cgtaaagta ac	52	
30	<210> 11 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
35	<400> 11 cttgctccag catccaggag gtccggtggt gcacacggct tgagatgcct ga	52	
40	<210> 12 <211> 61 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 12 agatcacact gtctttgccg tcattgaact cgcaacctaa ctgctgagtg aggacacgtc		60
	c		61
45	<210> 13 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
50	<400> 13 gaagggtaaa ggggtgtagg attgagtgag tcaggccaga aaccttagt ta	52	
55	<210> 14 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 14 aggacaatgc tcacctctt tgaccgcta tcacatcacc tgttcagggc ac	52	
60	<210> 15 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		

<400> 15

tacaggattc aacaattagt caaaaagtca tgagctaaca aaataggagc tt

52

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar si un sujeto tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso en un sujeto, que comprende las etapas de determinar, en una muestra aislada de dicho sujeto, la presencia de polimorfismos en las posiciones 27 de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, 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 C en SEQ ID NO: 12 es indicativa de un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o trastorno cardiovascular adverso.
2. Método 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 aórtico o una combinación de los mismos.
3. Método 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 de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, en el que la presencia en la posición 27 de una C en SEQ ID NO: 1, C en SEQ ID NO: 3, T en SEQ ID NO: 4, 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 C en SEQ ID NO: 12 es indicativa de necesitar terapia cardiovascular temprana y/o agresiva o de necesitar tratamiento cardiovascular profiláctico.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, que comprende además determinar uno o más de un factor de riesgo de enfermedad o trastorno cardiovascular seleccionado del grupo que consiste en edad, raza, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial, estado de tabaquismo, nivel de colesterol asociado a lipoproteína de baja densidad (LDL) o a lipoproteína de alta densidad (HDL), tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, antecedentes de insuficiencia cardíaca, diabetes, insuficiencia renal, hipertrofia ventricular izquierda, antecedentes de consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, antecedentes de ejercicio, dieta y antecedentes familiares de enfermedad o trastorno cardiovascular.
5. Método 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 fluido biológico, preferiblemente saliva, orina o sangre.
6. Método según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la presencia o ausencia del polinucleótido se identifica mediante la amplificación o la imposibilidad de 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 un marcador de cebador que es un resto detectable.
7. Kit que consiste en reactivos para detectar la identidad del nucleótido en la posición 27 de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12, que comprende los pares de cebadores específicos para la amplificación de una región que comprende al menos la posición 27 de las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12.

Figura 1

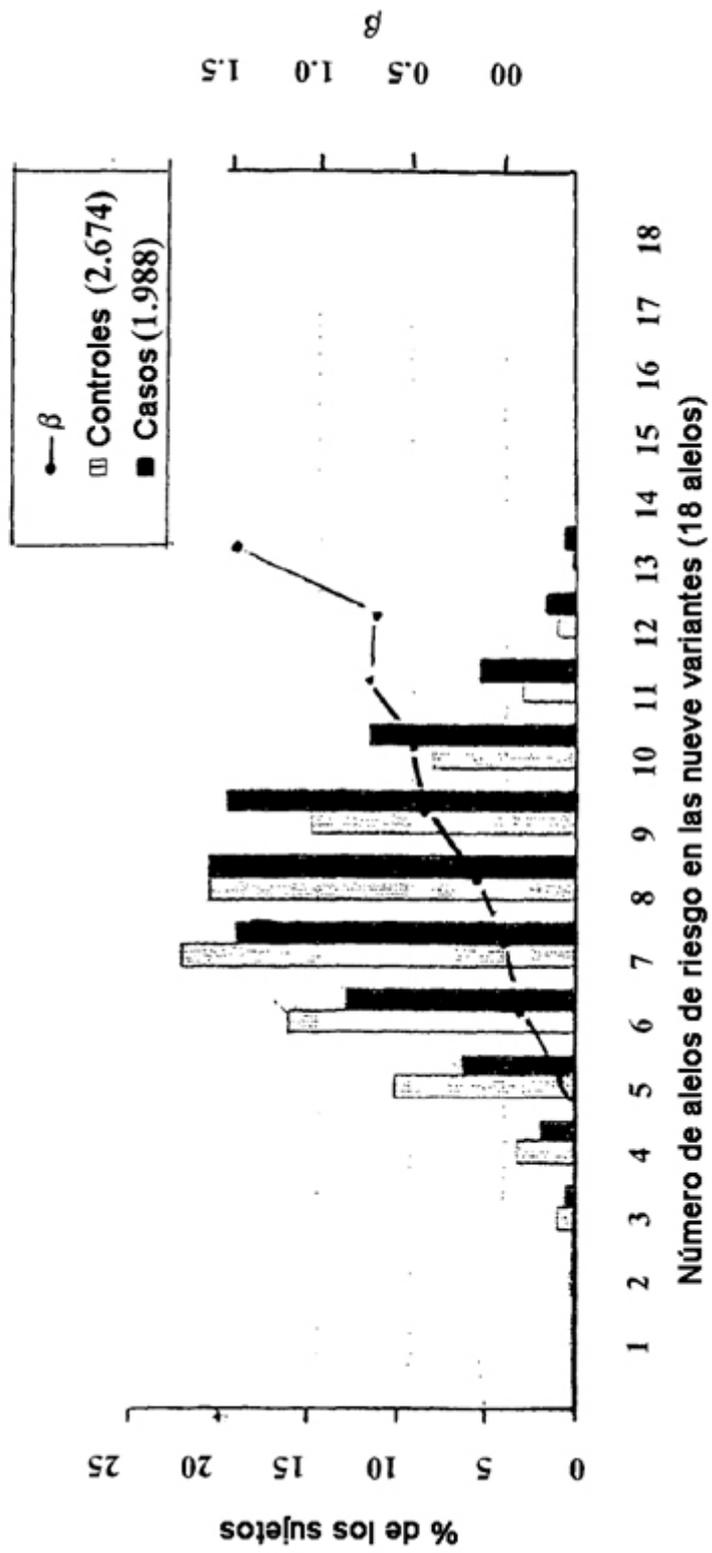


Figura 2

Alelos	Número de controles	Número de casos	OR [IC del 95%]	β	$\Delta\beta$	Valor de p
1	1	1	3,13 [0,04-245,35]	1,141	1,603	4×10^{-01}
2	5	1	0,63 [0,01-5,62]	-0,462	0,102	1×10^{-01}
3	48	8	0,52 [0,21-1,13]	-0,654	-0,798	1×10^{-01}
4	171	38	0,70 [0,47-1,01]	-0,356	-0,042	5×10^{-02}
5	540	127	0,74 [0,58-0,93]	-0,314	-0,231	7×10^{-03}
6	862	254	0,92 [0,77-1,11]	-0,083	-0,083	4×10^{-01}
7	1186	379	1,00	0	0	1
8	1103	410	1,16 [0,99-1,37]	0,148	0,148	7×10^{-02}
9	791	389	1,54 [1,30-1,83]	0,437	0,284	5×10^{-07}
10	435	230	1,65 [1,35-2,02]	0,501	0,069	7×10^{-07}
11	160	107	2,09 [1,59-2,76]	0,737	0,236	2×10^{-07}
12	50	32	2,00 [1,22-3,23]	0,693	-0,044	4×10^{-03}
13	8	11	4,30 [1,56-12,41]	1,458	0,765	2×10^{-02}
14	1	1	3,13 [0,04-245,35]	1,141	-0,317	4×10^{-01}

← Grupo de referencia

Figura 3

Cocientes de probabilidades de los quintiles de alelos de riesgo (nueve variantes genéticas)

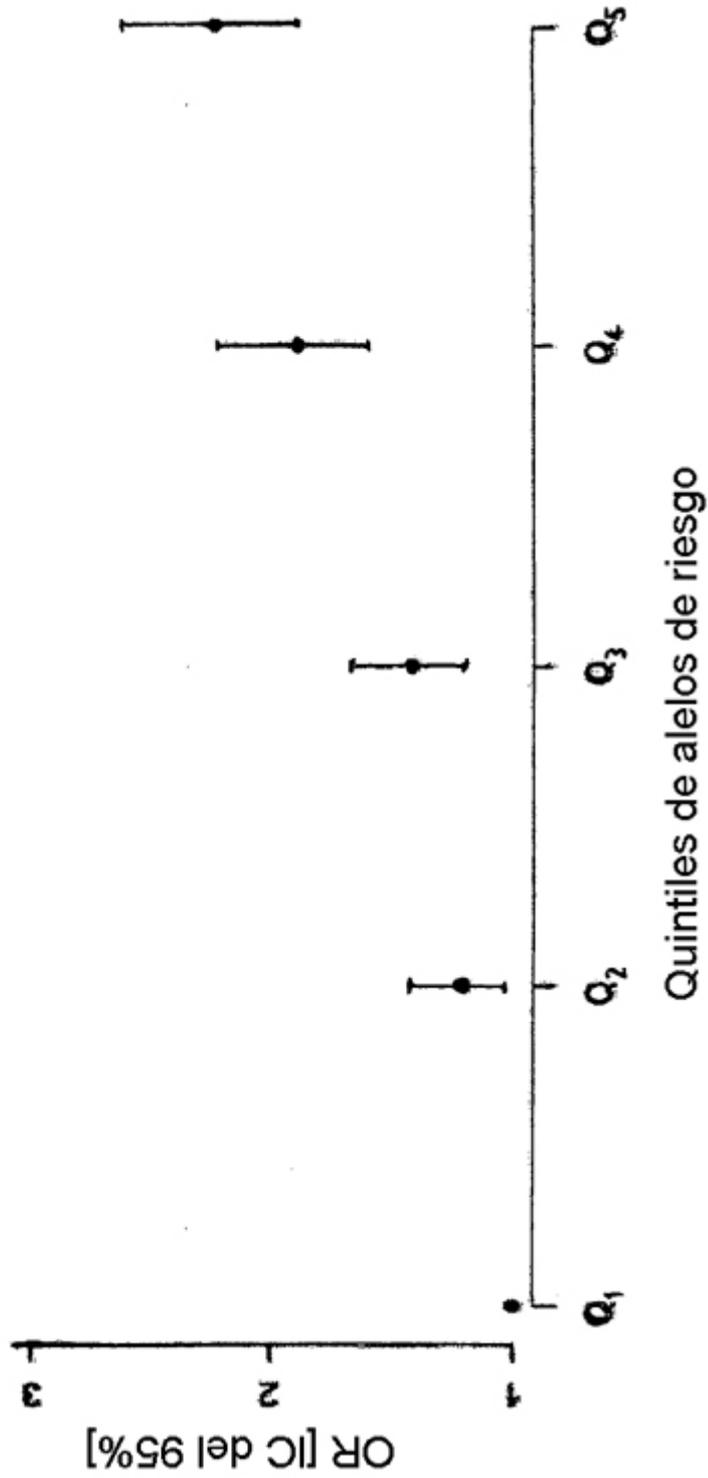


Figura 4

Quintil	Alelos	Número de controles	Número de casos	OR [IC del 95%]	β	$\Delta\beta$	Valor de p
Q ₁	1-6	1627	429	1	0	0	-
Q ₂	7	1186	379	1,21 [1,04-1,42]	0,191	0,191	1,6 x 10 ⁻⁰²
Q ₃	8	1103	410	1,41 [1,21-1,65]	0,344	0,153	1,5 x 10 ⁻⁰⁵
Q ₄	9	791	389	1,87 [1,59-2,18]	0,626	0,282	3,7 x 10 ⁻¹⁴
Q ₅	10-14	654	381	2,21 [1,87-2,61]	0,793	0,167	5,0 x 10 ⁻²¹