

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 797**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C12Q 1/6876** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 14194902 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2857525**

54 Título: **Procedimiento de determinación de una dosis adecuada de estatina**

30 Prioridad:

**29.02.2008 GB 0803833**

**07.07.2008 GB 0812414**

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

**26.02.2020**

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED  
(100.0%)**

**Buxton Court, 3 West Way, Botley**

**Oxford OX2 0JB , GB**

72 Inventor/es:

**LINK, EMMA;**

**PARISH, SARAH;**

**COLLINS, RORY y**

**LATHROP, MARK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

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

**ES 2 744 797 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

Procedimiento de determinación de una dosis adecuada de estatina

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar una dosificación adecuada para un individuo que necesita tratamiento con una estatina.

**Antecedentes de la invención**

10 Las estatinas son una clase ampliamente utilizada de medicamentos que reducen el colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) al inhibir la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) reductasa y, por lo tanto reducir la producción de colesterol por el hígado. La evidencia aleatoria a gran escala muestra que la terapia con estatinas reduce la incidencia de ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares y revascularizaciones en aproximadamente una quinta parte por 1 mmol/L de reducción de colesterol LDL.<sup>1</sup> Los beneficios logrados con el uso de estatinas parecen estar relacionados principalmente con el riesgo absoluto de un individuo de tales eventos, y al tamaño absoluto de la reducción de colesterol LDL. Los beneficios adicionales observados con el tratamiento más intensivo con estatinas han dado lugar a una tendencia hacia el uso de dosis más altas de estatinas.

15 En raras ocasiones, las estatinas pueden causar dolor o debilidad muscular con niveles elevados de creatina quinasa en la sangre (es decir, miopatía) y, en una minoría de casos, esto puede conducir a la degradación muscular y la liberación de mioglobina en la circulación (es decir, rabdomiólisis) con riesgo de insuficiencia renal y muerte.<sup>2</sup> Los mecanismos por los cuales las estatinas causan miopatía siguen siendo desconocidos, pero parecen estar relacionados con las concentraciones de estatinas en la sangre. La incidencia de miopatía es de aproximadamente uno por cada 10.000 pacientes por año con dosis estándar de estatinas (como 20-40 mg de simvastatina al día),<sup>3</sup> pero el riesgo aumenta (posiblemente aproximadamente diez veces) con dosis más altas de estatinas (como 80 mg de simvastatina al día<sup>4</sup>). También se incrementa con el uso concomitante de ciertos medicamentos que interactúan para producir niveles elevados de estatinas en plasma. Por ejemplo, se ha encontrado que el gemfibrozilo administrado de forma concomitante aumenta el área bajo la curva de eliminación de estatinas (AUC) de 2 a 4 veces con varias estatinas y aumenta el riesgo de miopatía en muchos casos.<sup>5,6</sup> Uso concomitante de ciclosporina e itraconazol, y otros fármacos que inhiben la enzima CYP3A4 también han mostrado que aumentan varias veces la exposición a las estatinas plasmáticas y se han relacionado con la miopatía.<sup>7,8</sup> Estas asociaciones claras han dado lugar a advertencias en las etiquetas de los medicamentos contra el uso concomitante de dosis particulares de estatinas y otros ciertos medicamentos (especialmente gemfibrozilo, ciclosporina e itraconazol).<sup>2</sup>

20 Se considera que tales interacciones ocurren cuando la estatina y el fármaco concomitante comparten vías metabólicas comunes. Se ha postulado que la interacción de gemfibrozilo con estatinas está mediada a través de los genes de la enzima de glucuronidación UGT o a través de varios genes de CYP.<sup>5,7</sup> Varias estatinas (incluyendo lovastatina, simvastatina y atorvastatina) se metabolizan principalmente a través de la enzima CYP3A4, y se ha concluido que la mayoría de las interacciones farmacológicas clínicamente importantes que ocurren con estas estatinas son atribuibles al uso concurrente de agentes que son inhibidores potentes o sustratos de CYP3A4.<sup>7</sup> La pravastatina no se metaboliza a través de los genes CYP, pero su nivel plasmático puede estar influenciado por los genes que participa en su eliminación por transporte. Aunque el metabolismo de la rosuvastatina no parece depender del sistema CYP, se conocen varias interacciones farmacológicas de importancia clínica. Por ejemplo, cuando la rosuvastatina se combina con la ciclosporina, el AUC de la rosuvastatina aumentó de 7 a 11 veces y se ha sugerido que la inhibición de la ciclosporina del polipéptido C transportador de aniones orgánicos puede disminuir la captación hepática de la rosuvastatina.<sup>9</sup>

25 Se han investigado los efectos de más de 20 genes en la farmacocinética de las estatinas.<sup>4,10</sup> Para cinco de estos genes (SLCO1B1, CYP3A5, CYP2C9, ABCG2, ABCC2), al menos un estudio pequeño ha reportado asociaciones con los niveles plasmáticos de estatinas. El gen SLCO1B1 codifica la proteína de transporte de aniones orgánicos OATP1B1 que se sabe afecta la captación hepática y la excreción biliar de diversos fármacos. Los estudios in vitro indican que la mayoría de las estatinas y los ácidos de las estatinas son sustratos para el transportador SLCO1B1,<sup>11</sup> aunque se ha sugerido que su contribución a la captación hepática es menor para las estatinas lipofílicas (tales como simvastatina y lovastatina), las cuales se cree que se captan principalmente a través de infusión pasiva.<sup>12</sup> Una búsqueda en la literatura realizada por los presentes inventores encontró que se habían publicado 14 informes separados del impacto del gen SLCO1B1 en la farmacocinética de las estatinas (que involucran principalmente la pravastatina o la rosuvastatina). No todos los estudios arrojaron resultados estadísticamente significativos, y no se había realizado un análisis combinado de ellos, pero el impacto típico en la farmacocinética de las estatinas fue mucho menor que los aumentos multiplicados por el uso concomitante de gemfibrozilo o inhibidores potentes del CYP3A4. En consecuencia, no estaba claro si tales diferencias en los niveles plasmáticos de estatinas serían de gran importancia para el riesgo de miopatía relacionada con las estatinas.

Algunos estudios pequeños habían considerado previamente la relevancia directa de los posibles efectos secundarios musculares relacionados con las estatinas de varios genes candidatos, tal como el CYP3A4, que está

involucrado en el metabolismo de ciertas estatinas,<sup>13</sup> genes involucrados en la deficiencia de ubiquinona (coenzima Q<sub>10</sub>),<sup>14</sup> y los genes que codifican los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP).<sup>11</sup> Se han reportado asociaciones para la miopatía, mialgia o intolerancia con estatinas a  $p < 0.05$  "nominal" (es decir, antes de permitir el gran número de genes candidatos y SNP que se consideraron) con seis genes individualmente. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño y múltiples comparaciones, estos pequeños estudios no proporcionaron una buena evidencia a *priori* para ninguna asociación genética con la miopatía relacionada con las estatinas. Además, las diferencias aparentes en las tasas de miopatía en esos estudios pueden haber sido confundidas por las diferencias en las dosis de estatinas y el uso concomitante de otros fármacos.<sup>3</sup> En particular, un estudio<sup>15</sup> de 10 pacientes con miopatía y 26 controles informaron una asociación entre la miopatía entre los pacientes que toman pravastatina o atorvastatina y el haplotipo SLCO1B1 \*<sup>15</sup> (alelo rs4149056 C y alelo rs2306283 G) con un valor de p nominal  $< 0,01$ . Este pequeño estudio incluyó la exploración de asociaciones con 152 SNP en diferentes genes (así como algunas comparaciones de haplotipos) y con tres estatinas separadas (así como diferentes combinaciones de esas estatinas). El impacto de este gran número de comparaciones múltiples debe permitirse al interpretar los valores p nominales: dado que no todas las pruebas habrían sido independientes, el número efectivo de pruebas independientes fue entre 300 y 1000. Por lo tanto, la aplicación del enfoque de Bonferroni implicaría multiplicar cada valor p nominal por al menos 300, haciendo que un valor p valor nominal de 0,01 sea completamente no significativo.

### Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se describe un procedimiento para determinar la susceptibilidad de un individuo a la miopatía inducida por estatinas, que comprende detectar la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo, por lo que la presencia de uno o más más polimorfismos indican que el individuo tiene una susceptibilidad alterada a la miopatía inducida por estatinas.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para reducir el riesgo de miopatía en un individuo durante el tratamiento con una estatina, que comprende

- i) determinar la presencia o ausencia de i) genotipo de "alto riesgo" de uno o más polimorfismos que están asociados con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas o ii) genotipo de "bajo riesgo" de uno o más polimorfismos que están asociada con disminución del riesgo de miopatía inducida por estatinas;
- ii) clasificar al individuo según su susceptibilidad a la miopatía inducida por estatinas, en referencia a la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos detectados en la etapa i); y
- iii) determinar una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia a la susceptibilidad del individuo a la miopatía inducida por estatinas determinada en el paso ii), lo que reduce el riesgo de miopatía en un individuo durante el tratamiento,

en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en rs4149056, rs4363657, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs1045879, rs7969341, rs1045885, rs12369881 y rs12366582; y un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo AA;

un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

Preferiblemente, la etapa de detección comprende amplificar al menos la parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen SLCO1B1 que contiene uno o más polimorfismos, e identificar el nucleótido presente en al menos un alelo del polimorfismo(s) codificado por dicho ADN amplificado.

Preferiblemente, la etapa de detección comprende amplificar el exón 6 del gen SLCO1B1 que comprende el SNP rs4149056, más preferiblemente amplificar una secuencia de ácido nucleico que contiene el nucleótido en la posición 521 del gen SLCO1B1 e identificar el nucleótido presente en esa posición.

- 5 En otras realizaciones, la etapa de detección puede comprender alternativamente, o adicionalmente, amplificar al menos la parte del intrón 8 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs1871395 o rs12317268; al menos la parte del intrón 11 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs4363657, rs2900478 o rs4149100; o al menos la parte del intrón 14 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs4149081, rs11045879, rs7969341, rs11045885, rs12369881 o rs12366582; e identificar el nucleótido presente en al menos un alelo de uno o más polimorfismos codificados por dicho ADN amplificado.
- 10 En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención también pueden comprender amplificar al menos la parte del exón 5 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs2306283, o rs11045819; o al menos la parte del exón 15 del gen SLCO1B1 que comprende el SNP rs34671512; e identificar el nucleótido presente en al menos un alelo de uno o más polimorfismos codificados por dicho ADN amplificado.
- 15 Preferiblemente, los procedimientos de la invención implican el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores adecuados adaptados para amplificar y/o identificar el nucleótido presente en al menos un alelo de uno o más polimorfismos.
- En algunas realizaciones, dicha amplificación e identificación se pueden llevar a cabo en una sola etapa utilizando uno o más cebadores de amplificación específicos de alelo.
- 20 En otras realizaciones de los procedimientos de la invención, se pueden usar una o más sondas específicas de alelo para identificar el nucleótido presente en al menos un alelo de uno o más polimorfismos codificados por el ácido nucleico de prueba o dicho ADN amplificado.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para determinar una dosificación adecuada para un individuo que necesita tratamiento con una estatina, que comprende
- 25 i) determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo; y
- ii) determinar una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia al genotipo de uno o más polimorfismos, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo de alto riesgo heterocigoto u homocigoto y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo, en donde el genotipo de alto riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas y en el que el genotipo de bajo riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con una disminución del riesgo de miopatía inducida por estatinas,
- 30 en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en rs4149056, rs4363657, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs11045879, rs7969341, rs11045885, rs12369881 y rs12366582;
- y un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;
- 35 un genotipo de alto riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs11045885 o rs12366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs11045885 o rs12366582 se define como un genotipo AA;
- un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo GG;
- 40 un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo TT;
- un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y
- 45 un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona una estatina para su uso en el tratamiento de un individuo que necesita tratamiento con una estatina, comprendiendo el tratamiento:
- 50 i) determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo;
- ii) clasificar al individuo según su genotipo en uno o más polimorfismos según lo determinado en el paso i);
- y
- iii) administrar una dosis adecuada de una estatina, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo heterocigoto u homocigoto de alto riesgo, y una dosis más alta

es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo, en el que el genotipo de alto riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas y en el que el genotipo de bajo riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un menor riesgo de miopatía inducida por estatinas,

- 5 en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en los SNP rs4149056, rs4363657, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs1045879, rs7969341, rs1045885, rs12369881 y rs12366582; y

en el que

- 10 un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo AA;

- 15 un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

- 20 un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

Preferiblemente, los procedimientos de la invención implican la determinación de una estatina adecuada y una dosis adecuada de esa estatina para un individuo particular (es decir, un régimen de estatinas).

- 25 Aspectos adicionales proporcionan procedimientos análogos de tratamiento, o determinación de un régimen adecuado (es decir, fármaco y dosificación) para un individuo que necesita tratamiento con una estatina, que comprende la etapa de detectar la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo, en el que uno o más polimorfismos pueden ser un SNP en estrecha relación con el SNP rs4149056 y/o el SNP rs4363657, incluyendo, pero no limitándose a, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs11045879, rs7969341, rs11045885, rs12369881, o rs12366582.

- 30 En una realización, la estatina se selecciona de la lista que comprende lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina y rosuvastatina.

En las realizaciones preferidas, la estatina es simvastatina, en la que una dosis estándar es de 20 o 40 mg al día, y una dosis más alta es de 80 mg al día.

- 35 En realizaciones preferidas, los procedimientos de la invención se pueden usar para determinar una dosis adecuada o un régimen de estatinas para un individuo que necesita tratamiento con una estatina, en el que el individuo tiene un mayor riesgo de miopatía, por ejemplo a través del uso concomitante de medicamentos como la amiodarona, la ciclosporina o el gemfibrozilo que hacen más lento el aclaramiento de las estatinas, o mediante la disminución de la captación hepática o el aclaramiento renal de las estatinas debido a variantes genéticas o enfermedades.

- 40 También se describe un kit de diagnóstico in vitro para detectar la susceptibilidad de un individuo a la miopatía inducida por estatinas, que comprende uno o más reactivos para detectar la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo.

Preferiblemente, el uno o más reactivos comprenden uno o más cebadores de amplificación específicos de alelo o sondas específicas de alelo.

- 45 Preferiblemente, el uno o más reactivos comprenden cebadores de amplificación específicos de alelo o sondas específicas de alelo capaces de determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para el uno o más polimorfismos descritos anteriormente. Preferiblemente, los kits comprenden instrucciones para la amplificación y/o detección de los alelos de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1.

- 50 Preferiblemente, los kits comprenden instrucciones que definen una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia a si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para el uno o más polimorfismos, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo heterocigoto u homocigoto de alto riesgo, y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo.

## Descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 muestra los valores de probabilidad para cada SNP medidos por separado en el estudio de asociación inicial del genoma de 85 casos de miopatía caucásica y 90 controles caucásicos asignados a 80 mg de simvastatina por día. Los análisis incluyeron 316.184 (99.4 %) de los 318.237 SNPs en el Sentrix HumanHap300-Duo BeadChip (Illumina). Los resultados sobre la línea horizontal tienen valores p de SNP individuales  $<5 \times 10^{-7}$  (es decir, evidencia sólida de asociación). La flecha indica el SNP rs4363657 con un valor p de  $4 \times 10^{-9}$  ( $P=0,001$  altamente significativo después de la corrección para el número de SNPs que se midieron).
- 10 La Figura 2 muestra los valores de chi cuadrado para cada SNP medido versus el valor esperado dado el rango (gráfico de cuantil-cuantil) en el estudio de asociación de genoma completo. Las líneas sólidas y de puntos muestran la distribución esperada y el intervalo de confianza (IC) del 95 %, respectivamente, bajo la hipótesis nula de que no hay asociación en ningún locus. La flecha indica el SNP rs4363657 el cual está ubicado dentro del intrón 11 del gen SLCO1B1 en el cromosoma 12.
- 15 La Figura 3 muestra la razón de probabilidades para la miopatía asociada con el SNP rs4149056 en el gen SLCO1B1 dentro de diferentes categorías de participantes. Los cuadrados negros indican la razón de probabilidades en cada subdivisión (con un área proporcional a la cantidad de información estadística en cada subdivisión) y las líneas horizontales indican 95 % CI (que termina con una punta de flecha cuando CI se extiende más allá de la escala). El índice de probabilidad global y su IC del 95 % están indicados por un diamante sin sombreado.
- 20 La Figura 4 muestra el riesgo estimado de miopatía acumulada por el genotipo SLCO1B1 rs4149056 en participantes asignados a 80 mg de simvastatina diariamente.

## Definiciones

- 25 El término "marcador", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma. Un marcador puede ser un gen u otra secuencia de ácido nucleico identificable, como un marco de lectura abierto, una porción de un intrón o un segmento de ADN genómico intergénico. Preferiblemente, el marcador es un sitio polimórfico, preferiblemente un polimorfismo de un solo nucleótido.
- Un "sitio polimórfico" se refiere a la posición en una secuencia de ácido nucleico en la que se produce un polimorfismo. Un sitio polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases.
- 30 El término "polimorfismo" se refiere a una variación genética, o la aparición de dos o más secuencias alternativas determinadas genéticamente en un solo locus genético en una población. Cada versión de la secuencia con respecto al sitio polimórfico se conoce como un "alelo" del sitio polimórfico. Los polimorfismos preferidos tienen dos alelos, con el alelo menor que ocurre a una frecuencia mayor que 1 %, y más preferiblemente mayor que 5 % o 10 % de una población seleccionada. La forma alélica que ocurre con mayor frecuencia en una población seleccionada a veces se denomina forma "tipo salvaje". La forma alélica que ocurre con menos frecuencia en una población seleccionada a veces se denomina forma "mutante". Los organismos diploides pueden ser homocigotos o heterocigotos para las formas alélicas. Un polimorfismo bialélico tiene dos formas. Un polimorfismo trialélico tiene tres formas. Ejemplos de polimorfismos incluyen: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), número variable de repeticiones en tándem (VNTR), polimorfismos de nucleótido único (SNP), repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos, repeticiones de secuencias simples y elementos de inserción tal como Alu.
- 35 El término "SNP" o "polimorfismo de nucleótido único" es un polimorfismo que se produce en un sitio polimórfico ocupado por un solo nucleótido. El sitio del SNP suele ir precedido y seguido de secuencias altamente conservadas (por ejemplo, secuencias que varían en menos de 1/100 o 1/1000 miembros de una población). Como se usa en este documento, "SNP" es el plural de SNP. Los SNP son más frecuentemente dialélicos. Un alelo más común de un SNP se llama un alelo "mayor" o "de tipo salvaje" y un alelo alternativo de dicho SNP se llama un alelo "menor" o "mutante". Un SNP generalmente surge debido a la sustitución de un nucleótido por otro en el sitio polimórfico. Una transición es el reemplazo de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina. Una transversión es el reemplazo de una purina por una pirimidina o viceversa. Los SNP también pueden surgir de una eliminación de un nucleótido o una inserción de un nucleótido en relación con un alelo de referencia.
- 40
- 45
- 50
- 55 Los SNP tienden a ser evolutivamente estables de generación en generación y, como tales, se pueden usar para estudiar anomalías genéticas específicas en una población. Si los SNP ocurren en la región codificadora de la proteína, puede conducir a la expresión de una variante, a veces defectuosa, de la proteína que puede conducir al desarrollo de una enfermedad genética. Tales SNPs pueden por lo tanto servir como indicadores efectivos de la enfermedad genética. Algunos SNP pueden ocurrir en regiones no codificantes, pero, sin embargo, pueden dar como resultado un empalme diferencial o defectuoso, o niveles de expresión de proteínas alterados. Por lo tanto, los SNP se pueden usar como herramientas de diagnóstico para identificar individuos con una predisposición a ciertas enfermedades, genotipificando al individuo que padece la enfermedad en términos de las causas genéticas

subyacentes a la enfermedad y facilitando el desarrollo de fármacos en base en la información revelada con respecto al papel de las proteínas diana. En el proceso de patogenia.

Una "ubicación de SNP" o "locus de SNP" es un sitio polimórfico en el que se produce un SNP.

5 El término "enlace" como se usa en este documento se refiere a la asociación no aleatoria de alelos en dos o más sitios polimórficos. El término "enlace cercano" se refiere a una medida de desequilibrio de enlace que tiene un coeficiente de correlación cuadrado de  $r^2 > 0,8$ .

10 El término "ácido nucleico", como se usa en este documento, significa un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido de cadena simple o doble, de cualquier longitud, e incluye como ejemplos no limitativos, secuencias codificantes y no codificantes de un gen, secuencias sentido y antisentido, exones, intrones, ADN genómico, ADNc, pre-ARNm, ARNm, ARNr, ARNsi, ARNmi, ARNt, ribozimas, polinucleótidos recombinantes, secuencias de ADN o ARN de origen natural aisladas y purificadas, ARN sintético y secuencias de ADN, sondas de ácido nucleico, cebadores, y sus fragmentos. La referencia a un polinucleótido(s) debe entenderse de manera similar.

15 El término "fragmento" de una secuencia de polinucleótidos proporcionada en este documento es una subsecuencia de nucleótidos contiguos que es capaz de hibridación específica a un objetivo de interés, por ejemplo, una secuencia que tiene al menos 10 nucleótidos de longitud. Los fragmentos pueden comprender 10, preferiblemente 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 20 nucleótidos, más preferiblemente al menos 30 nucleótidos, más preferiblemente al menos 40 nucleótidos, más preferiblemente al menos 50 nucleótidos y lo más preferiblemente al menos 60 nucleótidos de nucleótidos contiguos de un polinucleótido. Se puede usar un fragmento de una secuencia de polinucleótidos como cebador, una sonda, incluido en una micromatriz o en procedimientos de identificación basados en polinucleótidos.

20 El término "oligonucleótido(s)" son ácidos nucleicos que generalmente tiene entre 5 y 100 bases contiguas, y con frecuencia entre 5-10, 5-20, 10-20, 10-50, 15-50, 15-100, 20-50, o 20-100 bases contiguas. Un oligonucleótido que es más largo que aproximadamente 20 bases contiguas puede denominarse polinucleótido. Un sitio polimórfico (polimorfismo) puede ocurrir en cualquier posición dentro de un oligonucleótido.

25 El término "cebador" se refiere a un polinucleótido, que normalmente tiene un grupo 3' OH libre, que se hibrida a una plantilla y se usa para cebar la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana.

El término "sonda" se refiere a un polinucleótido que se usa para detectar una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la sonda, en un ensayo basado en hibridación. La sonda puede consistir en un "fragmento" de un polinucleótido como se define en el presente documento.

30 El término "hibridar en condiciones restrictivas", y sus equivalentes gramaticales, se refiere a la capacidad de una molécula de polinucleótido para hibridar con una molécula de polinucleótido diana (tal como una molécula de polinucleótido diana inmovilizada en una transferencia de ADN o ARN, como una inmunoprecipitación Southern o inmunoprecipitación Northern ) en condiciones definidas de temperatura y concentración de sal. La capacidad de hibridar en condiciones de hibridación restrictivas se puede determinar hibridando inicialmente en condiciones menos restrictivas y luego aumentar la restricción a la restricción deseada.

35 Con respecto a las moléculas de polinucleótidos de más de aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones de hibridación restrictivas típicas no son más de 25 a 30°C (por ejemplo, 10°C) por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del dúplex nativo (ver en general, Sambrook et al, Eds, 1987, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al, 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing). La  $T_m$  para moléculas de polinucleótidos mayores de aproximadamente 100 bases se puede calcular mediante la fórmula  $T_m = 81,5 + 0,41 \% (G + C - \log (Na^+))$  (Sambrook et al., Eds, 1987, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton and McCarthy, 1962, PNAS 84: 1390). Las condiciones restrictivas típicas para un polinucleótido de más de 100 bases de longitud serían condiciones de hibridación como el prelavado en una solución de 6X SSC, 0,2 % SDS; hibridación a 65°C, 6X SSC, SDS al 0,2 % durante la noche, seguido de dos lavados de 30 minutos cada uno en 1X SSC, SDS al 0,1 % a 65°C y dos lavados de 30 minutos cada uno en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 65°C.

40 En una realización, las condiciones restrictivas utilizan formamida al 50 %, 5xSSC, fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sometido a sonicación (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y 10 % de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2xSSC y 50 % de formamida a 55°C, seguido de un lavado que comprende de 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

45 Con respecto a las moléculas de polinucleótido que tienen una longitud inferior a 100 bases, las condiciones de hibridación restrictivas a modo de ejemplo son de 5 a 10°C por debajo de  $T_m$ . En promedio, la  $T_m$  de una molécula de polinucleótido de longitud inferior a 100 pb se reduce en aproximadamente (500/longitud de oligonucleótido) °C.

55 El término "susceptibilidad", cuando se usa en relación con la miopatía inducida por estatinas o cualquier frase similar como "propensión" o "predisposición", significa que se ha descubierto que ciertos alelos están asociados con, o que predicen, miopatía inducida por el tratamiento con estatinas. Estos alelos de "alto riesgo" pueden ser el alelo

menor (o mutante), o el alelo principal (o de tipo salvaje). Por lo tanto, estos alelos están sobrerrepresentados en la frecuencia o en la tasa de transporte en individuos con riesgo de desarrollar miopatía inducida por estatinas en comparación con individuos que no son susceptibles a la miopatía inducida por estatinas. Por lo tanto, el término "susceptibilidad de un individuo a la miopatía inducida por estatinas" se refiere a una frecuencia estadísticamente mayor o menor de miopatía inducida por estatinas en un individuo que porta un alelo polimórfico particular, o genotipo (es decir, patrón alélico o polimorfismo) en comparación con la frecuencia en un miembro de la población que no porta el alelo polimórfico particular, o genotipo.

Se dice que un individuo que porta uno o ambos alelos de alto riesgo en un sitio polimórfico tiene un genotipo heterocigoto u homocigoto de "alto riesgo" para ese sitio polimórfico particular, respectivamente. Se dice que un individuo que no tiene un alelo de alto riesgo en particular tiene un genotipo homocigoto de "bajo riesgo".

El término "miopatía", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier síntoma muscular, como dolor, debilidad o sensibilidad, que se acompaña de una concentración elevada de creatina quinasa sérica e incluye mialgia, miositis, miopatía y rbdomiólisis.

El término "muestra biológica", como se usa en el presente documento, significa una muestra biológica derivada de un paciente que va a ser examinado. La muestra biológica puede ser cualquier muestra adecuada conocida en la técnica en la que se pueda detectar la expresión de los marcadores seleccionados. Se incluyen células individuales y poblaciones celulares obtenidas de tejidos o fluidos corporales. Ejemplos de fluidos corporales adecuados para ser analizados son plasma, sangre, linfa y orina.

El término "que comprende" como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones significa "que consiste al menos en parte de", es decir, cuando se interpretan afirmaciones en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones las cuales incluyen el término, las características, precedidas por ese término en cada afirmación, deben estar todas presentes, pero también pueden estar presentes otras características. Los términos relacionados, tales como "comprenden" y "comprendido", se deben interpretar de manera similar.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la identificación de que los polimorfismos en el gen SLCO1B1, particularmente el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs4149056 o uno o más polimorfismos en estrecha relación con rs4149056, que incluyen, pero no se limitan a rs4363657, están fuertemente asociados ( $p=4 \times 10^{-9}$  no ajustado) con miopatía. La susceptibilidad de un individuo a la miopatía inducida por estatinas que se puede atribuir a la variación en el gen SLCO1B1 es, por lo tanto, el riesgo acumulativo que se produce por la combinación de los efectos de los polimorfismos en el gen SLCO1B1.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para determinar la susceptibilidad de un individuo a la miopatía inducida por estatinas, que comprende detectar la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo, por lo que la presencia de uno o más polimorfismos indica que el individuo tiene una susceptibilidad alterada a la miopatía inducida por estatinas.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para reducir el riesgo de miopatía en un individuo durante el tratamiento con una estatina, que comprende

i) determinar la presencia o ausencia de i) genotipo de "alto riesgo" de uno o más polimorfismos que están asociados con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas o ii) genotipo de "bajo riesgo" de uno o más polimorfismos que están asociados con disminución del riesgo de miopatía inducida por estatinas;

ii) clasificar al individuo según su susceptibilidad a la miopatía inducida por estatinas, por referencia a la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos detectados en la etapa i); y

iii) determinar una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia a la susceptibilidad del individuo a la miopatía inducida por estatinas determinada en el paso ii), lo que reduce el riesgo de miopatía en un individuo durante el tratamiento,

en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en rs4149056, rs4363657, rsl871395, rsl2317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rsl1045879, rs7969341, rsl1045885, rsl2369881 y rs12366582; y en donde un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rsl871395, rsl2317268, rs7969341, rs1045885 o rsl2366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rsl871395, rsl2317268, rs7969341, rsl045885 o rsl2366582 se define como un genotipo AA;

un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rsl2369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rsl2369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

- 5 un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

Un individuo que porta uno o ambos alelos de alto riesgo en un sitio polimórfico puede ser clasificado por tener un genotipo heterocigoto u homocigoto de "alto riesgo" para ese sitio polimórfico particular, respectivamente. Un individuo que no tiene un alelo de alto riesgo en particular puede clasificarse por tener un genotipo homocigoto de "bajo riesgo".

Todas las codificaciones de alelos se muestran como el alelo mutante (menor) o de tipo salvaje (mayor), respectivamente, para la orientación hacia adelante (cadena positiva).

Las técnicas para determinar la presencia o ausencia de alelos particulares en la muestra biológica se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de discriminación de mutaciones basadas en secuencias tales como amplificación, secuenciación de ácido nucleico o hibridación de ácido nucleico. Muchos procedimientos actuales para la detección de la variación alélica son revisados por Nollau et al, Clin. Chem. 43: 1114-1120, 1997; y en los libros de texto estándar, por ejemplo "Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. by U. Landegren, Oxford University Press, 1996 y "PCR", 2nd Edition por Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

En realizaciones preferidas, la presente invención comprende una etapa de aislamiento de un ácido nucleico que comprende uno o más polimorfismos por detectar.

El ácido nucleico analizado se puede aislar de la muestra biológica utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte. A modo de ejemplo, tal ácido nucleico puede aislarse amplificando el ácido nucleico antes del análisis. Los expertos en la materia conocen las técnicas de amplificación e incluyen, entre otras, clonación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de alelos específicos (PASA), ligadura de cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada y así sucesivamente

La técnica de hibridación de sondas polinucleotídicas marcadas con polinucleótidos inmovilizados sobre soportes sólidos, tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nylon, también se puede usar para seleccionar muestras genómicas o de ADNc. De manera similar, las sondas pueden acoplarse a perlas e hibridarse con la secuencia diana. El aislamiento puede efectuarse utilizando protocolos conocidos de la técnica, tales como la separación magnética. Más arriba se dan condiciones de hibridación y lavado restrictivas de ejemplo.

Preferiblemente, la etapa de detección comprende amplificar al menos la parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen SLCO1B1 que contiene uno o más polimorfismos, e identificar el nucleótido presente en al menos un alelo del polimorfismo(s) codificado por dicho ADN amplificado. Preferiblemente, la etapa de detección comprende amplificar el exón 6 del gen SLCO1B1 que comprende el SNP rs4149056, más preferiblemente amplificar una secuencia de ácido nucleico que contiene el nucleótido en la posición 521 del gen SLCO1B1 e identificar el nucleótido presente en al menos un alelo en esa posición.

En otras realizaciones, la etapa de detección puede, alternativamente, o adicionalmente comprender la amplificación de al menos la parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen SLCO1B1 que contiene uno o más polimorfismos en estrecha relación con el SNP rs4149056, incluidos, entre otros hasta al menos la parte del intrón 8 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs1871395 o rs12317268; al menos la parte del intrón 11 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs4363657, rs2900478 o rs4149100; al menos la parte del intrón 14 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs4149081, rs11045879, rs7969341, rs11045885, rs12369881, rs12366582; e identificar el nucleótido presente en al menos un alelo de uno o más polimorfismos codificados por dicho ADN amplificado. En algunas realizaciones, la presente invención también puede comprender la etapa de amplificar una secuencia de ácido nucleico en la muestra biológica del individuo que contiene uno o más SNP adicionales que pueden proporcionar información independiente sobre el riesgo de miopatía, incluido, entre otros, el exón 5 del gen SLCO1B1 que comprende los SNP rs2306283, o rs11045819; o al menos la parte del exón 15 del gen SLCO1B1 que comprende el SNP rs34671512.

Muchas variaciones del protocolo de amplificación básico son bien conocidas por el técnico experto. Los medios de detección basados en PCR pueden incluir la amplificación múltiple de una pluralidad de marcadores simultáneamente. Por ejemplo, los cebadores de PCR se pueden seleccionar para generar productos de PCR que no se superpongan en tamaño y se puedan analizar simultáneamente. Alternativamente, es posible amplificar diferentes marcadores genéticos con cebadores que están marcados diferencialmente y, por lo tanto, cada uno puede detectarse diferencialmente en la misma reacción. Se conocen otras técnicas en el arte para permitir el análisis múltiple de una pluralidad de marcadores.

5 El nucleótido presente en al menos un alelo del polimorfismo en el ácido nucleico de prueba o el producto de amplificación se puede detectar o ensayar en una variedad de formas, que incluyen, pero no se limitan a análisis de tamaño, detectando cebadores oligonucleotídicos específicos marcados en los productos de reacción, hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), detección de exonucleasa S1 específica de alelo, secuenciación, hibridación de ácidos nucleicos, etc. Por ejemplo, dicha detección puede comprender la secuenciación del ácido nucleico que codifica el polimorfismo para determinar el alelo o alelos presentes. Alternativamente, la detección puede comprender la etapa de hibridar el producto de la etapa de amplificación con una sonda que está adaptada para unirse a uno de los alelos del polimorfismo genético.

10 Preferiblemente, la sonda de hibridación es una sonda marcada de forma detectable. Se pueden usar marcadores detectables, como radioisótopos, enzimáticos, fluorescentes, quimioluminiscentes y bioluminiscentes para facilitar la detección. El etiquetado y la visualización de las sondas marcadas se pueden llevar a cabo de acuerdo con procedimientos de la técnica conocida.

Por comodidad, la sonda de hibridación puede inmovilizarse sobre un soporte de fase sólida que incluye resinas (como poliacrilamidas), carbohidratos (como sefarsa), plásticos (como policarbonato) y perlas de látex.

15 En una realización preferida de la invención, varias sondas capaces de hibridar específicamente con variantes alélicas pueden unirse a un soporte de fase sólida. Los oligonucleótidos se pueden unir a un soporte sólido mediante una variedad de procesos, incluida la litografía. Por ejemplo, los chips pueden contener al menos 250.000 oligonucleótidos (GeneChip, Affymetrix). El análisis de detección de mutación que utiliza estos chips que comprenden oligonucleótidos, también denominados "conjuntos de sondas de ADN" se describe, por ejemplo, en Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244 y en Kozal et al. (1996) Nature Medicine 2:753. En una realización, un chip comprende todas las variantes alélicas de al menos una región polimórfica de un gen. El soporte de fase sólida se pone en contacto con un ácido nucleico de prueba y se detecta la hibridación con las sondas específicas. Por consiguiente, la identidad de numerosas variantes alélicas de uno o más genes se puede identificar en un simple experimento de hibridación. Por ejemplo, la identidad de la variante alélica del polimorfismo de nucleótido en SNP rs4149056 y/o uno o más polimorfismos en estrecha relación con rs4149056 u otras posibles regiones polimórficas en el gen SLCO1B1 se puede determinar en un solo experimento de hibridación.

Los oligonucleótidos adecuados para amplificar y secuenciar los exones específicos y los intrones del gen SLCO1B1 se muestran en la Tabla 4 dada a continuación y se proporcionan como SEQ ID NO: 1-51.

30 En algunas realizaciones, la detección puede comprender una etapa de sondeo del ácido nucleico de prueba o el producto de la etapa de amplificación con una primera sonda que está adaptada para unirse a uno de los alelos del polimorfismo genético, y preferiblemente, sondear con una segunda sonda que está adaptada para unirse al otro de los alelos del polimorfismo genético. Las sondas son preferiblemente secuencias de ácido nucleico diseñadas para unirse a uno de los alelos. Si una de las sondas se une al producto de amplificación, el sujeto es homocigoto para ese alelo. Sin embargo, si ambas sondas se unen al producto de amplificación, el sujeto es heterocigoto para cada alelo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para determinar una dosificación adecuada para un individuo que necesita tratamiento con una estatina, que comprende

- 40 i) determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo; y
- ii) determinar una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia al genotipo de uno o más polimorfismos, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo de alto riesgo heterocigoto u homocigoto y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo,

45 en el que el genotipo de alto riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas y en el que el genotipo de bajo riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un menor riesgo de miopatía inducida por estatinas,

en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en rs4149056, rs4363657, rsl871395, rsl2317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rsl1045879, rs7969341, rsl1045885, rsl2369881 y rs12366582; y

50 en el que un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rsl871395, rsl2317268, rs7969341, rs1045885 o rsl2366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rsl871395, rsl2317268, rs7969341, rsl1045885 o rsl2366582 se define como un genotipo AA;

55 un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rsl2369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rsl2369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

- 5 un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

En un aspecto adicional, la invención proporciona estatina para su uso en el tratamiento de un individuo que necesita tratamiento con una estatina, comprendiendo el tratamiento:

- 10 i) determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo;

ii) clasificar al individuo según su genotipo en uno o más polimorfismos según lo determinado en el paso i);  
y

- 15 iii) administrar una dosis adecuada de una estatina, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo de alto riesgo, y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo, en donde el genotipo de alto riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas y en el que el genotipo de bajo riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un menor riesgo de miopatía inducida por estatinas,

20 en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en los SNP rs4149056, rs4363657, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs1045879, rs7969341, rs1045885, rs12369881 y rs12366582; y

en el que un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

25 un genotipo de alto riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo AA;

un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs1045879 se define como un genotipo TT;

- 30 un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

35 Preferiblemente, los procedimientos de la invención implican determinar una estatina adecuada y una dosis adecuada de esa estatina (es decir, un régimen de estatinas) para un individuo en particular. Por ejemplo, las autoridades de salud recomiendan dosis más altas de estatinas, como 80 mg de simvastatina por día, para el uso de rutina, a pesar del aumento en el riesgo promedio de miopatía. Tales regímenes de estatinas pueden ser adecuados para individuos que no tienen el alelo C de "alto riesgo" del SNP rs4149056 que está asociado con miopatía inducida por estatinas. Para un individuo que porta el alelo C de "alto riesgo", un régimen de estatinas que comprende una  
40 dosis estándar de una estatina más potente puede proporcionar un nivel similar de reducción de colesterol LDL, sin el aumento en el riesgo de miopatía asociado con la dosis más alta de estatinas.

Los procedimientos de la invención pueden implicar adicionalmente la determinación de un régimen de estatinas adecuado (es decir, un fármaco y una dosis), o la administración de una dosis de una estatina, para o a un individuo que tenga un riesgo elevado de miopatía, en donde se debe usar la estatina en combinación con una o más terapias  
45 alternativas para reducir el LDL.

Los kits se usan preferiblemente para llevar a cabo los procedimientos de la invención.

También se describe un kit de diagnóstico in vitro para detectar la susceptibilidad de un individuo a la miopatía inducida por estatinas, que comprende uno o más reactivos para detectar la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo.

- 50 Preferiblemente, los kits comprenden uno o más reactivos para detectar la presencia o ausencia de alelos de "alto riesgo" de uno o más polimorfismos que están asociados con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas,

y/o la presencia o ausencia de alelos de "bajo riesgo" de uno o más polimorfismos que se asocian con un menor riesgo de miopatía inducida por estatinas.

5 Preferiblemente, el kit comprende reactivos de muestreo de ADN y, preferiblemente, reactivos de amplificación por PCR. Preferiblemente, los reactivos de amplificación de PCR comprenden Taq polimerasa. Preferiblemente, el uno o más reactivos comprenden uno o más cebadores de amplificación específicos de alelo o sondas específicas de alelo.

10 Preferiblemente, el uno o más reactivos comprenden cebadores de amplificación específicos de alelo o sondas específicas de alelo capaces de determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos descritos con detalle anteriormente, más preferiblemente para una citosina (C) o una timina (T) en el SNP rs4149056.

El kit también incluirá convenientemente un reactivo de control (positivo y/o negativo) y/o un medio para detectar el ácido nucleico. En la mayoría de los casos, los kits se formatearán para los ensayos conocidos en la técnica, y más generalmente para los ensayos de PCR, hibridación Northern o ELISA Southern, como se conoce en la técnica.

15 Preferiblemente, el kit comprende medios para sondear el producto de la etapa de amplificación para determinar el genotipo del individuo que se está probando. El kit comprende preferiblemente una primera sonda que está adaptada para unirse a uno de los alelos del polimorfismo genético, y preferiblemente, una segunda sonda que está adaptada para unirse a otro alelo del polimorfismo genético. Las sondas son preferiblemente secuencias de ácido nucleico diseñadas para unirse a uno de los alelos. Preferiblemente, las sondas son sondas marcadas de forma detectable como se ha explicado anteriormente.

20 Las sondas se pueden unir a una matriz sólida como se discutió anteriormente o se pueden empaquetar con reactivos para unirlas a la matriz. La matriz sólida o el sustrato pueden estar en forma de cuentas, placas, tubos, varillas, tiras o biochips. Los biochips o placas con ubicación direccionable y placas de microtitulación discretas son particularmente útiles.

25 El kit estará compuesto por uno o más contenedores y también puede incluir equipo de muestreo, por ejemplo, botellas, bolsas (como bolsas de fluidos intravenosos), viales, jeringas y tubos de ensayo. Otros componentes pueden incluir agujas, diluyentes, reactivos de lavado y tampones. De manera útil, el kit puede incluir al menos un recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa.

30 Preferiblemente, los kits comprenden instrucciones para la amplificación y/o detección de los alelos de uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1.

35 Preferiblemente, los kits comprenden instrucciones que definen una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia a si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo heterocigoto u homocigoto de alto riesgo, y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo.

40 Los procedimientos de la invención se pueden usar para determinar un régimen de estatinas adecuado (es decir, un fármaco y una dosis) para un individuo que necesita tratamiento con una estatina, en el que el individuo tiene un mayor riesgo de miopatía, por ejemplo a través de la necesidad de una gran reducción del colesterol LDL que respalda el uso de dosis más altas de una estatina, el uso concomitante de ciertos medicamentos como la amiodarona, la ciclosporina o el gemfibrozilo que retardan la eliminación de las estatinas, o mediante la disminución de la captación hepática o la eliminación renal de las estatinas debido a variantes genéticas o enfermedad. En tales situaciones, la genotipificación de variantes en el gen SLCO1B1 puede indicar que una dosis particular de una estatina particular no es apropiada debido al riesgo elevado de miopatía. Por ejemplo, para las personas que tienen un genotipo heterocigoto u homocigoto para aquellos SNP asociados con un mayor riesgo de miopatía, podría ser apropiado no usar un régimen de dosis altas de una estatina en particular. Esto puede llevar a la elección de una dosis diferente de estatinas y/o estatinas y/o la adición de otra terapia para reducir el colesterol LDL y/u otras intervenciones para reducir el riesgo cardiovascular y minimizar el riesgo de miopatía.

50 La selección de variantes genéticas debería permitir así obtener todos los beneficios potenciales de la terapia con estatinas de forma más segura. La detección de estas variantes genéticas también puede ser relevante para los efectos de los fármacos en clases distintas a las estatinas que son transportadas por SLCO1B1 (tal como el agente hipoglucémico oral repaglinida).

En una realización, la estatina se selecciona de la lista que comprende lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina y rosuvastatina. En realizaciones preferidas, la estatina es simvastatina, en la que una dosis estándar es de 20 o 40 mg al día, y una dosis más alta es de 80 mg al día.

55 Una dosis estándar puede definirse como la dosis diaria de estatina requerida para reducir el colesterol LDL en un 30-45 %. Las dosis estándar para las otras estatinas son típicamente alrededor de 10-20 mg de atorvastatina, 40-80

mg para fluvastatina, 40 mg para lovastatina, 40 mg para pravastatina, 2 mg para pitavastatina y 10 mg para rosuvastatina. Una dosis más alta se puede definir como un aumento de dos veces o más en la dosis diaria estándar de una estatina.

5 En algunos grupos de pacientes étnicos, se espera que la dosis diaria de cada estatina requerida para reducir el colesterol LDL en un 30-45 %, es decir, una "dosis estándar", sea más baja que las dosis estándar descritas anteriormente. Una "dosis más alta" también será correspondientemente más baja. Por ejemplo, los estudios farmacocinéticos realizados en los Estados Unidos han mostrado una elevación aproximada de 2 veces en la exposición media de rosuvastatina en sujetos asiáticos (con origen filipino, chino, japonés, coreano, vietnamita o asiático-indio) en comparación con un (Caucásico) grupo de control de raza blanca.<sup>16</sup> En tales poblaciones de  
10 pacientes, una dosis "estándar" y "más alta" de una estatina particular puede comprender una disminución de dos veces o más en la dosis diaria respectiva de las estatinas descritas anteriormente.

Como se describió anteriormente, la presente invención se basa en la identificación de que los polimorfismos en el gen SLCO1B1, particularmente el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs4149056 o uno o más polimorfismos en estrecha relación con rs4149056, incluyendo, pero no limitado a rs4363657, son fuertemente asociado (no ajustado  $p=4 \times 10^{-9}$ ) con miopatía. La variación en la variante de SNP rs4363657 no afecta la codificación del gen, pero la proteína codificada se ve alterada por el SNP rs4149056 (Val174Ala) que está en una relación casi completa con el SNP rs4363657 ( $r^2 = 0.97$ ).

Como se explica con más detalle en los ejemplos dados a continuación, la frecuencia entre los controles del alelo C del SNP rs4363657 no codificante fue de 0,13 y la razón de probabilidades para la miopatía fue de 4,3 (IC 95 % 2,5-7,2) por alelo C y 17,4 (4,8-62,9) para homocigotos CC vs TT. La frecuencia del alelo C de la codificación rs4149056 SNP (Val174Ala) entre los controles fue de 0,13 y la razón de probabilidades para la miopatía fue de 4,5 (IC 95 % 2,6-7,7) por alelo C y 16,9 (4,7-61,1) para homocigotos CC vs TT.

El riesgo estimado de miopatía acumulada por el genotipo rs4149056 en los participantes asignados a 80 mg de simvastatina al día se muestra en la Figura 4. Los homocigotos CC tuvieron un riesgo acumulado del 18 % de miopatía, mientras que el genotipo CT se asoció con un riesgo acumulado del 3 % y los homocigotos TT tuvieron un riesgo acumulativo de solo el 0,6 %. Esto indica que el 63 % de los casos de miopatía en el primer año y el 60 % de todos los casos de miopatía podrían atribuirse a la variante rs4149056 C en el gen SLCO1B1.

Se estudiaron otras variantes en el gen SLCO1B1 que alteraron la proteína codificada. Se encontró que tres eran relativamente comunes y solo en un desequilibrio de enlace moderado con rs4149056, lo que indica que proporcionan información independiente. Después de tener en cuenta el efecto de rs4149056, las variantes más comunes de los SNP funcionales rs2306283 y rs34671512 se asociaron con tasas más altas de miopatía inducida por estatinas que fueron estadísticamente significativas para rs2306283 y de significación estadística límite para rs34671512. Algunos de estos SNP en SLCO1B1 (incluidos, entre otros, rs4149056) también produjeron modificaciones en el efecto reductor del colesterol de la terapia con estatinas. La susceptibilidad de un individuo a la miopatía inducida por estatinas que se puede atribuir a la variación en el gen SLCO1B1 es, por lo tanto, el riesgo acumulativo que se produce por la combinación de los efectos de los polimorfismos en el gen SLCO1B1.

Como se discutió anteriormente, varios estudios pequeños habían considerado previamente la relevancia directa de los posibles efectos secundarios musculares relacionados con las estatinas de varios genes candidatos, como el CYP3A4 que está involucrado en el metabolismo de ciertas estatinas,<sup>13</sup> genes involucrados en la ubiquinona (coenzima Q<sub>10</sub>) deficiencia,<sup>14</sup> y los genes que codifican los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP).<sup>11</sup> Las asociaciones para la miopatía, mialgia o intolerancia a las estatinas se informaron a una "nominal"  $p < 0,05$  (es decir, antes de permitir el gran número de genes candidatos y SNPs que se consideraron) con seis genes individualmente. En el estudio SEARCH que es la base de esta aplicación, hubo cuatro genes (ABCB1/MDR1, COQ2, HTR3B y HTR7) para los cuales el estudio a gran escala de los inventores no confirmó las asociaciones putativas con confianza estadística, además de un quinto gen, CYP2D6, que no estaba bien cubierto por la pantalla del genoma (Tablas Suplementarias 2, 4 y 5 en <sup>4</sup>).

Por el contrario, el número comparativamente grande de casos de miopatía relacionada con estatinas entre pacientes que tomaban una dosis alta de simvastatina en el estudio SEARCH y de controles bien pareados de la misma población, junto con la replicación independiente en la gran población separada del Heart Protection Study (HPS) (como se publicó en <sup>4</sup>), ha mostrado inequívocamente que la variación en un solo gen (en rs4149056 en SLCO1B1) representa la mayoría de los casos de miopatía inducida por estatinas.

Las asociaciones entre los genotipos rs4149056 y la farmacocinética de las estatinas en informes publicados previamente de estudios clínicos han sido resumidas por los presentes inventores (Tabla complementaria 6 en <sup>4</sup>), y se muestran por tipo de estatina en la Tabla 1 dada a continuación. La asociación es estadísticamente significativa para cada estatina por separado, con la excepción de la fluvastatina (para la cual solo hay un estudio).

La evidencia de estudios previos que muestran que el alelo SLCO1B1 rs4149056 C produce aumentos moderados en los niveles plasmáticos de varias estatinas diferentes apoya la extrapolación de que rs4149056 no solo puede influir en el riesgo de miopatía con simvastatina sino también con varias otras estatinas.

Tabla 1: Resumen de estimaciones por tipo de estatina de estudios in vivo de la asociación entre las concentraciones de estatina y SLCO1B1 rs4149056 SNP.

<b>Estatinas</b>	<b>Número población estudiada</b>	<b>de % mayor de AUC por alelo C entre estudios de esta estatina</b>	
Pravastatina (ácido)	5	35 (17, 56)	
Rosuvastatina (ácido)	5	31 (15, 42)	
Pitavastatina (ácido)	1	37 (10, 71)	
Simvastatina (ácido)	1	61 (30, 100)	
Atorvastatina (ácido)	1	54 (24, 92)	
Fluvastatina (ácido)	1	10 (-9, 34)	
<b>Estatinas en 14 general ácidos</b>		<b>35 (26,45)</b>	Heterogeneidad entre 6 grupos de estatinas, $\chi^2_5 = 8,55, p=0,13$

La invención se ilustrará ahora de manera no limitativa por referencia a los siguientes Ejemplos.

## 5 Ejemplos

El ensayo SEARCH (Estudio de la efectividad de las reducciones adicionales en colesterol y homocisteína) entre 12.064 participantes con antecedentes de infarto de miocardio, destinado a mostrar si la asignación a 80 mg de simvastatina por día durante aproximadamente 7 años produce de forma segura mayores reducciones en el riesgo cardiovascular que la asignación a un régimen diario de simvastatina de 20 mg estándar.<sup>17</sup>

- 10 Durante un seguimiento promedio de aproximadamente 6 años, entre los 6031 participantes asignados con 80 mg de simvastatina por día en la SEARCH, se produjeron 49 casos definidos de miopatía y se identificaron otros 49 participantes con miopatía incipiente (ver Procedimientos). Más de la mitad de estos 98 casos de miopatía definitiva o incipiente surgieron durante el primer año de seguimiento. Los mecanismos por los cuales las estatinas causan miopatía siguen siendo desconocidos, pero parecen estar relacionados con las concentraciones de estatinas en la sangre. Los análisis de seguridad interinos en SEARCH revelaron una asociación fuerte, pero no reconocida
- 15 previamente, entre el uso de amiodarona y la miopatía entre los participantes asignados con 80 mg de simvastatina al día, con un riesgo relativo de miopatía de casi 10. Como consecuencia, todos los participantes que tomaron amiodarona en SEARCH fueron provistos con 20 mg de simvastatina al día (independientemente de su asignación original), y el uso concomitante de amiodarona ahora está contraindicado con dosis más altas de simvastatina. Se planteó la hipótesis de que podrían existir asociaciones igualmente fuertes entre la miopatía inducida por estatinas
- 20 en el tratamiento con altas dosis de estatinas y las variantes genéticas, especialmente las que afectan los niveles sanguíneos de estatinas.

## Procedimientos

### Participantes y muestras en SEARCH

- 25 En SEARCH, 12.064 sobrevivientes de infarto de miocardio de edades comprendidas entre 18 y 80 años se asignaron al azar para recibir 80 mg de simvastatina al día versus 20 mg de simvastatina al día.<sup>17</sup> Los criterios de exclusión en la visita de selección incluyeron niveles de creatina quinasa (CK) en sangre por encima de 3 x el límite superior de lo normal (ULN; que es de 250 IU/L) para el laboratorio del centro coordinador, niveles de transaminasa de alanina en sangre (ALT) por encima de 1,5 x ULN y el uso concomitante de medicamentos que aumentan el
- 30 riesgo de miopatía (es decir, fibratos, niacina en dosis altas, ciclosporina, nefazodona, metotrexato y antifúngicos de azol sistémicos o antibióticos macrólidos). Después de la asignación al azar, se programó el seguimiento de los participantes a los 2, 4, 8 y 12 meses, y luego a intervalos de 6 meses. Se buscó información sobre cualquier posible infarto de miocardio, hospitalización por angina, accidente cerebrovascular, procedimiento vascular, embolia pulmonar, cáncer u otra experiencia adversa grave. Además, cualquier nuevo dolor o debilidad muscular inexplicable

fue explícitamente buscado y registrado. Se tomó una muestra de sangre en cada visita de seguimiento para el ensayo de laboratorio central de CK y ALT.

Después de un promedio de seguimiento de seis años, 49 de los 6031 participantes asignados con 80 mg de simvastatina al día habían desarrollado miopatía "definida" (definida como síntomas musculares con CK >10 x ULN). Se consideró que otros 49 participantes tenían miopatía "incipiente" en función de su perfil sanguíneo de seguridad (es decir, CK >3 x ULN y 5 x valor de detección más ALT >1.7 x valor de detección, pero sin ALT elevado solo observado), independientemente de si se informaron o no los síntomas musculares. Todos estos 49 casos definidos y 48 de los 49 casos incipientes cumplieron con sus 80 mg de simvastatina al día cuando se realizó el diagnóstico. Por el contrario, entre los 6033 participantes asignados con 20 mg de simvastatina al día, solo se identificaron 2 casos definidos y 6 casos incipientes de miopatía.

El estudio de asociación amplio del genoma se limitó a los 96 participantes diagnosticados con miopatía incipiente o definitiva mientras tomaban 80 mg de simvastatina al día y para los cuales se disponía de muestras de capa leucoplaquetaria. Entre los participantes restantes quienes fueron asignados a tomar 80 mg de simvastatina al día, se seleccionaron 96 controles con una muestra de capa leucoplaquetaria con coincidencia de sexo, edad, tasa de filtración glomerular estimada y el uso de amiodarona en la línea de base. No había conocimiento de que estos casos y los controles estuvieran relacionados, y todos excepto un caso (que fue excluido de los análisis principales) fueron clasificados por sí mismos como Caucásicos.

#### Genotipificación, secuenciación e imputación en SEARCH

Se enviaron muestras de capa leucoplaquetaria congeladas desde el centro coordinador en Oxford al Centre National de Génotypage (CNG) en París, Francia. En el CNG, se extrajo el ADN, se midió su concentración mediante fluorescencia (procedimiento Picogreen) y se examinó su calidad mediante gel y la amplificación por PCR de 2 marcadores microsatélite. Se obtuvo ADN adecuado para la genotipificación para 85 (90 %) de los 96 casos y para 90 (94 %) de los 96 controles. La genotipificación de SNP se realizó con el lanzamiento comercial de Sentrix HumanHap300-Duo BeadChip (Illumina),<sup>18</sup> que involucra un panel de 318.237 etiquetas SNP derivadas de los datos de recursos de International HapMap que pretenden capturar una variación común (>5 %) en el genoma.<sup>19</sup> El genotipo se solicitó con éxito para >95 % de los SNP en todos los casos y controles, por lo que no se excluyeron casos o controles del análisis principal. Se usó el escalamiento multidimensional<sup>20</sup> para detectar individuos con ancestros diferentes u otros valores atípicos: cinco casos agrupados de los casos restantes y los controles, lo que indica que pueden tener ancestros diferentes (datos no mostrados). Dado el pequeño número de participantes y la fuerza de la asociación putativa, los participantes (excepto el de origen no caucásico conocido: véase más arriba) se mantuvieron en los análisis principales (pero los análisis de sensibilidad se realizaron con ellos excluidos).

Los principales análisis incluyeron 316.184 (99,4 %) de los 318.237 SNPs en el panel de Illumina, con la exclusión de 1098 SNPs no genotipificados con éxito en ninguna muestra, 139 que fueron monomorfas en esta población, 813 que faltaban en >10 % de participantes, y 3 que se desviaron entre los controles del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE  $p < 1,6 \times 10^{-7}$ ; corrección de Bonferroni  $p < 0,05$ ). No pareció necesario ajustar las asociaciones de estos SNP con la miopatía para el control genómico, por lo que la variación adicional en las estadísticas de prueba se atribuye a la subestructura de la población:<sup>21</sup> los valores de chi cuadrado para la comparación del valor observado para cada SNP versus su valor esperado dado el orden del rango seguido de la distribución esperada, y la mediana de las estadísticas de la prueba de chi cuadrado de 316.184 dividida por la mediana del valor de chi cuadrado esperado en SNP nulos no es estadísticamente diferente de 1,0 (ver Resultados).

Tras el análisis de todo el genoma, los exones dentro del gen SLCO1B1 se volvieron a secuenciar en 83 casos y 89 controles con suficiente ADN: 38 genotipos adicionales y 141 variantes<sup>21</sup> imputadas (utilizando HapMap CEU como una población de referencia) con frecuencia de alelos menores no cero se incluyeron en el análisis de casos y controles. El panel de Illumina no cubre la variación en el gen CYP3A4, que es un candidato plausible para la miopatía inducida por estatinas, por lo que también fue resecuenciado en 54 casos y 62 controles con suficiente ADN: 20 (67 %) de las 30 variantes identificadas cumplieron con el criterio de inclusión de control de calidad para los análisis de casos y controles, y también se incluyeron 11 SNPs más imputados. La resecuenciación de los genes SLCO1B1 y CYP3A4 se realizó utilizando los amplicones de PCR generados por PRIMER3 para cubrir todo el conjunto de exones y partes de los intrones (15 fragmentos para SLCO1B1 y 18 fragmentos para CYP3A4). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar el gen SLCO1B1 se muestran en la Tabla 4 dada a continuación. La PCR se realizó en volúmenes de reacción de 8 uL utilizando 1 unidad de ADN polimerasa Taq (Abgene, Epsom, Reino Unido) y 20 ng de ADN genómico. Los productos de la PCR se purificaron utilizando el gel Bio-gel® P100 (Bio-Rad Inc, Hercules, CA, Estados Unidos) y se secuenciaron con el procedimiento de química de secuenciación del ciclo Bigdye Terminator (Applied Biosystems, Palo Alto, CA, Estados Unidos). Las reacciones se purificaron utilizando Sephadex™ G-50 Superfine (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) antes de aplicar los productos a los analizadores de ADN ABI 3730. La detección de variantes genéticas se realizó con un software interno (programa Genalys; disponible en <http://www.cng.fr>).

#### Replicación en el estudio de protección del corazón

Entre julio de 1994 y mayo de 1997, un total de 20.536 pacientes en el Reino Unido con enfermedad vascular oclusiva preexistente o diabetes fueron aleatorizados para recibir 40 mg de simvastatina al día o un placebo como parte del Heart Protection Study (HPS)<sup>22</sup>. En cada evaluación de seguimiento (a los 4, 8 y 12 meses, y luego cada 6 meses), se interrogó a los participantes sobre cualquier nuevo dolor o debilidad muscular inexplicable, y se extrajo sangre en cada visita de seguimiento para el ensayo del laboratorio central de CK y ALT. Durante un seguimiento promedio de 5 años, se identificaron 24 casos de miopatía (10 definitivos más 14 incipientes; 23 mientras tomaban estatinas) entre 10.269 participantes asignados con 40 mg de simvastatina por día versus 12 casos (4 definitivos más 8 incipientes; 3 mientras tomaban estatinas) entre 10.267 asignados con placebo. Usando ADN extraído de 19.856 participantes (97 %), los SNP rs4149056 y rs2306283 en SLCO1B1 se genotipificaron con éxito en 16.664 participantes clasificados como caucásicos. Luego se evaluaron los efectos de estos genotipos en el riesgo de miopatía y en la reducción del colesterol LDL.

#### Análisis estadístico y software

Las pruebas (genotípicas) estándar 1 d.f. (tendencia) y 2 d.f. de asociación con el genotipo y las relaciones impares para la miopatía de regresiones logísticas se calcularon utilizando SAS y PLINK (v.1.00).<sup>23</sup> Para las comparaciones de todo el genoma, los valores de p no corregidos para cada SNP por separado que fueron más pequeños que  $5 \times 10^{-7}$  se consideraron pruebas sólidas para la asociación, mientras que entre  $5 \times 10^{-5}$  y  $5 \times 10^{-7}$  se consideraron pruebas moderadas (Véase el informe del Wellcome Trust Case-Control Consortium para una explicación<sup>24</sup>). Se usó Haploview edición v4.0 candidato <sup>25</sup> para estimar el desequilibrio de ligamiento y trazar los resultados de la asociación para SNPs genotipificados. Las frecuencias de haplotipos y los riesgos asociados se estimaron utilizando herramientas en el paquete haplo.stats (v1.3.1)<sup>26</sup> en R (v2.6.1).<sup>27</sup> Las posiciones físicas se refieren a la construcción NCBI 36 del genoma humano, y los alelos se expresan en la cadena directa del genoma humano de referencia (construcción NCBI 36). Se utilizaron Ensembl versión 46 y NCBI dbSNP compilación 127 e informes publicados<sup>11,28,29</sup> para clasificar los SNP como sinónimos o no sinónimos y para identificar su ubicación dentro de intrones o exones. El riesgo atribuible de miopatía con 80 mg de simvastatina al día se estimó mediante un análisis de la tabla de vida en el que la censura al momento de la muerte o al final del estudio de prescripción de simvastatina antes de la miopatía se consideró independiente del genotipo. Los participantes que recibieron amiodarona al inicio del estudio se excluyeron de este análisis porque su dosis de simvastatina se redujo al principio del ensayo (principalmente durante el primer año de seguimiento) debido a un alto riesgo de miopatía.

### **Resultados**

#### Características de los participantes

Como se había observado anteriormente en el estudio SEARCH,<sup>30</sup> el uso concomitante de amiodarona aumentó el riesgo de miopatía entre los participantes asignados a 80 mg de simvastatina por día, con un riesgo relativo de 8,8 (IC del 95 %: 4,2 a 18,4) durante el primer año de seguimiento. Después de detectar esta asociación al inicio del ensayo, a todos los participantes que tomaron amiodarona se les administró 20 mg de simvastatina por día (independientemente de su asignación original), lo que puede explicar el riesgo relativo menos extremo observado posteriormente. Se observaron aumentos moderados en el riesgo de miopatía con 80 mg de simvastatina al día entre los participantes de mayor edad, entre las mujeres (quienes tendían a ser mayores debido a la elegibilidad del ensayo que requería un infarto de miocardio previo), entre aquellos con evidencia de función renal disminuida y entre aquellos que tomaban bloqueadores de los canales de calcio al inicio del estudio.

#### Estudio de asociación de genoma completo

El estudio de asociación de genoma incluyó 85 casos sospechosos de miopatía y 90 controles, todos los cuales habían estado tomando 80 mg de simvastatina diariamente en SEARCH. El análisis de SNP único produjo una asociación fuerte con miopatía ( $p=4 \times 10^{-9}$  no corregida; corrección de Bonferroni  $p<0,001$ ) para el SNP no codificante rs4363657 ubicado dentro del intrón 11-12 del gen SLCO1B1 en el cromosoma 12 (sin ningún otro SNP en ninguna otra región que produzca una  $p<10^{-5}$  no corregida: Figura 1). La prevalencia del alelo C rs4363657 fue de 0,13 entre los controles, con razón de probabilidades para miopatía de 4,3 (CI del 95%: 2,5-7,2) por alelo C y 17,4 (4,8-62,9) para homocigotos CC frente a TT.

Hubo poca evidencia de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. Tampoco los resultados parecen verse afectados materialmente por la subestructura de la población u otras fuentes potenciales de desviación sistemática: el valor de chi cuadrado para rs4363657 estuvo bien fuera del intervalo de confianza del 95 % de la gráfica del cuantil-cuantil, mientras que los valores para todos los otros genotipos SNP estaban dentro de este intervalo de confianza (Figura 2).

#### Genotipificación de candidato y análisis de haplotipos

A la luz de esta fuerte asociación de miopatía con rs4363657, se genotipificaron SNP adicionales dentro de SLCO1B1 (+/-10 kb) mediante resecuenciación o se imputaron a partir de SNP genotipificados. De estos, dos SNP genotipificados (y nueve imputados) presentaban un desequilibrio de enlace casi completo con rs4363657 (cada  $r^2>0,95$ ). Pero, entre ellos, solo rs4149056 (Val174Ala) en el exón 6 fue "no sinónimo" (es decir, alteró la proteína codificada): la prevalencia de su alelo C fue de 0,13 entre los controles, con una proporción de probabilidades de

miopatía de 4,5 (2,6-7,7) por alelo C y 16,9 (4,7-61,1) para homocigotos CC vs TT ( $p=2 \times 10^{-9}$ ; se imputaron cuatro resultados faltantes). Estos datos se resumen en la Tabla 2 dada a continuación.

SNP	Posición	Valor P tendencia	Valor P genotípico	Alelo de riesgo	Otro alelo	Frecuencia alelo de riesgo	
						Caso	Control
rs4363657	21259989	$4,1 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-8}$	C	T	0,46	0,13
rs4149056	21222816	$2,4 \times 10^{-9}$	$1,1 \times 10^{-8}$	C	T	0,45	0,13

SNP	Posición	HWE Valor P en controles	OR (95% CI) por alelo de riesgo	OR heterocigoto	OR homocigoto	Cambio gen y aminoácidos si son no sinónimos	
rs4363657	21259989	$4,1 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-8}$	C	T	0,46	0,13
rs4149056	21222816	$2,4 \times 10^{-9}$	$1,1 \times 10^{-8}$	C	T	0,45	0,13

Tabla 2: Polimorfismos de nucleótidos individuales asociados fuertemente con miopatía.

- 5 Se encontraron otras cinco variantes no sinónimas dentro de SLCO1B1, incluyendo tres que eran relativamente comunes: rs2306283 (44 % de frecuencia alélica G en los controles), rs11045819 (18 % de frecuencia alélica) y rs34671512 (8 % de frecuencia alélica C). Solo hubo un desequilibrio de vinculación moderado entre rs4149056 y estas tres variantes (cada par  $r^2 < 0,20$ ). En los haplotipos con rs4149056, tanto el alelo rs2306283 G como el alelo rs34671512 C se asociaron con un límite significativo ( $p=0,03$  y  $p=0,06$ , respectivamente) menores riesgos de miopatía y, por lo tanto, pueden proporcionar información independiente sobre el riesgo de miopatía, mientras que rs11045819 no parece influir en el riesgo.

Resultados del subgrupo para rs4149056

15 La Figura 3 muestra que las relaciones impares para la miopatía asociada con rs4149056 no fueron significativamente diferentes entre los casos de miopatía definida o incipiente o en subgrupos con respecto a la edad de línea base, sexo, función glomerular estimada o el uso de amiodarona (aunque con un poder limitado para detectar diferencias modestas). Si ese es el caso, entonces implica que los efectos del genotipo y los efectos de estos otros factores (en particular el uso de amiodarona) sobre el riesgo de miopatía son multiplicativos (por ejemplo, un aumento de 4 veces en un heterocigoto para rs4149056 y un aumento de 10 veces con el uso concomitante de amiodarona se traduciría en un riesgo 40 veces mayor de miopatía). La escala multidimensional se usó para detectar individuos con diferentes ancestros u otros valores atípicos<sup>20</sup>: excluyendo a los 4 participantes que parecían agruparse lejos de los casos restantes y los controles solo cambiaron el valor de p para rs4149056 de  $2,4 \times 10^{-9}$  a  $2,0 \times 10^{-9}$  (y no alteró las regiones genómicas clasificadas como fuertemente significativas).

Riesgo atribuible de miopatía.

25 Los controles se seleccionaron sobre la base de no haber desarrollado miopatía y, por lo tanto, había una menor probabilidad de que tuvieran el alelo rs4149056 de mayor riesgo. Después de permitir este sesgo de selección, la prevalencia de la población del alelo C se estimó en 0,146 (consistente con el rango de 0,14-0,22 encontrado previamente entre los caucásicos<sup>28</sup>). Sobre la base de esta prevalencia, se utilizó un análisis de la tabla de vida para estimar el riesgo de miopatía acumulativa entre los participantes que tomaron 80 mg de simvastatina diariamente según su genotipo rs4149056 (Figura 4). Los homocigotos de CC tuvieron un riesgo acumulativo de 18 %, principalmente durante el primer año, mientras que el genotipo de CT se asoció con un riesgo acumulado de alrededor del 3 %. Por el contrario, el riesgo acumulado de miopatía fue de solo un 0,6 % entre los homocigotos TT que tomaron 80 mg de simvastatina. En general, más del 60 % de estos casos de miopatía podrían atribuirse a la variante rs4149056 C en el gen SLCO1B1. Estos datos se resumen en la Tabla 3 dada a continuación.

Año 1	
Frecuencia	Atribuible a genotipo

Genotipo	población	N	%	N	% del total
TT	0,730	12	0,34	0,0	0
CT	0,249	17	1,38	12,8	75
CC	0,021	16	15,25	15,6	98
Todos los genotipos	1,000	45	0,91	28,4	63

Año 5					
Atribuible a genotipo					
Genotipo	Frecuencia población	N	%	N	% del total
TT	0,730	21	0,63	0,0	0
CT	0,249	32	2,83	24,9	78
CC	0,021	19	18,55	18,4	97
Todos los genotipos	1,000	72	1,56	43,3	60

Tabla 3: Números y porcentajes acumulativos con miopatía por genotipo.

#### Replicación en estudio de protección del corazón

Entre los 16.664 genotipificados participantes en HPS,<sup>22</sup> las variantes rs4149056 y rs2306283 no se asociaron con diferencias significativas en los niveles de colesterol LDL antes del tratamiento. Antes de la asignación al azar, todos estos participantes tomaron 4-6 semanas de 40 mg de simvastatina al día y la reducción promedio en el colesterol LDL fue del 40,57 % (SE 0,12). Cuando ambas variantes se consideraron juntas, las reducciones fueron 1,28 % (0,25) más pequeñas por el alelo Rs4149056 C ( $p < 0,0001$ ) y 0,62 % (0,18) más grandes por el alelo G rs2306283 ( $p < 0,0001$ ). En general, en el caso de HPS, hubo 23 casos definitivos o incipientes de miopatía entre los participantes que tomaron su simvastatina de 40 mg asignados por día en comparación con 9 casos entre los participantes asignados con placebo que no tomaban una estatina. En consecuencia, a diferencia del estudio SEARCH, es probable que solo alrededor de la mitad de los casos de miopatía entre los participantes que toman simvastatina en el HPS hayan sido inducidos por estatinas. Aun así, la comparación dentro de HPS (restringida a caucásicos) entre 21 casos de miopatía en 40 mg de simvastatina y 16.643 controles genotipificados sin miopatía confirmó que el rs4149056 SNP está asociado con miopatía ( $p = 0,004$ ), aunque con un riesgo relativo menos extremo de 2,6 (1,3-5,0) por alelo C. Estos 17.000 participantes genotipificados sin miopatía también brindan una población de control alternativa para los casos de SEARCH, con una relación impar de 4,7 (3,5-6,4) por rs4149056 alelo C y un valor  $p$  más fuerte de  $3 \times 10^{-28}$ .

#### Comparaciones con estudios previos

Ningún estudio publicado previamente ha proporcionado evidencia estadística concluyente de asociaciones de variantes genéticas con miopatía inducida por estatinas. En un estudio de 8 genes candidatos en 10 casos de miopatía y 26 controles, se informó una asociación con los SNP de SLCO1B1,<sup>15</sup> pero esos resultados no fueron estadísticamente sólidos después del ajuste para comparaciones múltiples. En el presente estudio, no se encontraron asociaciones significativas para los SNP en ninguno de los otros genes que previamente se había informado que estaban asociados con miopatía o con la farmacocinética de las estatinas (Tablas suplementarias 2, 4 y 5 en <sup>4</sup>). En particular, los 20 SNP genotipificados y 11 SNP imputados en el gen CYP3A4 (que participa en la eliminación de simvastatina<sup>13</sup>) no se asociaron significativamente con la miopatía (Tabla complementaria 2b en <sup>4</sup>). Se ha informado que el 10 % de los casos de miopatía inducida por estatinas remitidos para pruebas genéticas tuvieron o fueron portadores de una de las tres miopatías metabólicas hereditarias (enfermedad de McArdle, deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa II o deficiencia de mioadenilato desaminasa).<sup>31</sup> En el presente estudio, sin embargo, no hubo asociaciones significativas de miopatía con SNP en esos genes.

#### Discusión

Los estudios SEARCH y HPS proporcionan pruebas muy sólidas de que al menos una variante genética común en SLCO1B1 altera sustancialmente el riesgo de miopatía inducida por estatinas. Entre los pacientes que toman 20-40 mg de simvastatina diariamente (o dosis estándar de otras estatinas), la incidencia de miopatía suele ser de

aproximadamente uno por cada 10.000 pacientes por año y el impacto de estas variantes genéticas en el riesgo absoluto de miopatía probablemente sea pequeño (según lo indicado por nuestros resultados entre los participantes en HPS). Por el contrario, el riesgo de miopatía puede aumentar diez veces con 80 mg de simvastatina por día u otros regímenes de estatinas en dosis altas, así como con el uso concomitante de ciertos medicamentos<sup>31</sup> (como ciclosporina, gemfibrozilo y, como se encuentra en SEARCH, amiodarone<sup>30</sup>). Por lo tanto, el uso de tales medicamentos en personas que toman regímenes de estatinas en dosis altas que tienen el alelo C del polimorfismo rs4149056 puede producir riesgos absolutos particularmente altos de miopatía (como lo sugieren los efectos aproximadamente multiplicativos del genotipo rs4149056 y el uso de amiodarona en la Figura 3).

El SLCO1B1 codifica el polipéptido orgánico transportador de aniones OATP1B1, que media la absorción hepática de diversos fármacos, incluida la mayoría de las estatinas y los ácidos de las estatinas. Varios estudios clínicos pequeños han investigado las asociaciones entre los genotipos de rs4149056 SLCO1B1 y la farmacocinética de la eliminación de estatinas (que generalmente involucran la medición de los niveles de estatinas en la sangre durante un período de 24 horas después de la administración de una dosis regular única).<sup>11</sup> Aunque no todos los estudios arrojaron resultados estadísticamente significativos, la evidencia colectiva indica que los niveles de estatinas son más altos en personas con el alelo C de este polimorfismo. Cinco de esos estudios también examinaron haplotipos de rs4149056 y rs2306283 y, en conjunto, esos estudios sugieren que la variante rs2306283 G está asociada con concentraciones más bajas de estatinas (datos no mostrados), lo cual es consistente con el menor riesgo de miopatía observado en el estudio SEARCH. Las variantes genéticas que disminuyen la absorción hepática también podrían reducir el efecto reductor del colesterol de un régimen de estatinas. Nuestros datos de los participantes en el estudio de protección del corazón confirmaron que estas variantes causan pequeñas diferencias en las reducciones de colesterol LDL producidas por la simvastatina.<sup>22</sup>

El panel Illumina HumanHap300-Duo se estima a partir de muestras CEU de HapMap para proporcionar aproximadamente un 75 % de cobertura genómica para SNP comunes ( $r^2 \geq 0,8$ ) en caucásicos. Dado el número de casos y controles, el presente estudio de asociación del genoma tenía solo un 50 % de potencia para detectar razones de probabilidades de aproximadamente 4 para las variantes comunes con un valor p de "significación fuerte" de  $5 \times 10^{-7}$ . Por lo tanto, la existencia de variantes que conllevan un riesgo de miopatía de 2 a 4 veces mayor no se puede descartar mediante este análisis. Los genes con evidencia previa de vínculos con la miopatía o la farmacocinética de las estatinas se pueden considerar como "candidatos" que requieren valores de p no corregidos menos extremos para proporcionar una buena evidencia de asociación. La Tabla 5 complementaria en<sup>4</sup> enumera aproximadamente 100 de estos SNP, lo que representa aproximadamente 1/3000 de la pantalla del genoma; por lo tanto, un valor de p de  $1,5 \times 10^{-3}$  (es decir, 3000 veces  $5 \times 10^{-7}$ ) podría considerarse "significativo" para estos candidatos. Sin embargo, no se lograron tales valores de p para ninguno de los SNP estudiados en estas regiones.

En conclusión, este estudio de asociación de genoma completo ha identificado con éxito variantes genéticas comunes en el gen SLCO1B1 que están asociadas con alteraciones sustanciales en el riesgo de miopatía inducida por simvastatina. Es probable que estos hallazgos se apliquen a otras estatinas porque la miopatía es un efecto de clase y se ha mostrado que los polimorfismos de SLCO1B1 afectan los niveles en sangre de varias estatinas. Además, estas variantes pueden ser relevantes para los efectos de los fármacos en otras clases que son transportados por SLCO1B1 (como el agente hipoglucémico oral repaglinida). La genotipificación de los polimorfismos SLCO1B1 ofrece la posibilidad de adaptar la dosis de estatina y el monitoreo de seguridad (especialmente durante el primer año de tratamiento cuando los riesgos absolutos de la miopatía son mayores) para lograr los beneficios de la terapia con estatinas de forma más segura y efectiva en el futuro.

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la resecuenciación del gen SLCO1B1

Número de exón	Nombre	Secuencia	Uso	SEQ ID No.
Exón1	SLCO1B1_P001_PF	AATGGTCTTGCAGTTAATTGGG	PCR	1
	SLCO1B1_P001_PR	TCCCTTACCCTGTATCAAACCT	PCR	2
	SLCO1B1_P001_SF	TGGCAACTGGAGTGAACCTCTT	secuenciación	3
	SLCO1B1_P001_SR	TTCCCTCTACTCCCACCCTT	secuenciación	4
Exón2	SLCO1B1_P002_PF	TCTACTCTGTGCAAGGGGCT	PCR	5
	SLCO1B1_P002_SF	TCCAGCATTGACCTAGCAGA	secuenciación	6
	SLCO1B1_P002_SR	TCGTGATCAATCCAAAACCA	PCR y secuenciación	7

ES 2 744 797 T3

(continuación)				
Número de exón	Nombre	Secuencia	Uso	SEQ ID No.
Exón3	SLCO1B1_P003_PF	TGTTTTTCAGCTGGCTTCCT	PCR	8
	SLCO1B1_P003_PR	GGTCTAACGTAGGTTGCTCTGAA	PCR	9
	SLCO1B1_P003_SF	AGAATGTACTGCCACTCCCCT	secuenciación	10
	SLCO1B1_P003_SR	TATTGCCAAATTGCCTGTGA	secuenciación	11
Exón4	SLCO1B1_P004_PF	ATGCCATGGTTTATTCTTTTTCA	PCR	12
	SLCO1B1_P004_PR	TAAGTTTCTCCCCATGTGC	PCR	13
	SLCO1B1_P004_SF	TGTCTTTGAGGGAAGGCACT	secuenciación	14
	SLCO1B1_P004_SR	GCTTCAGTGAAATGATGGGAA	secuenciación	15
Exón5	SLCO1B1_P005_PF	ATAACCCACTTAGCCTGGGG	PCR	16
	SLCO1B1_P005_PR	GCTGCCTGTGTGTTCTCAA	PCR	17
	SLCO1B1_P005_SF	GGGGAAGATAATGGTGCAA	secuenciación	18
	SLCO1B1_P005_SR	CGGCAGGTTTATCATCCAGT	secuenciación	19
Exón6	SLCO1B1_ex6_PF	TTGTCAAAGTTTGCAAAGTG	PCR y secuenciación	20
	SLCO1B1_ex6_PR	GCCAAGAATGCATGGTTCTT	PCR y secuenciación	21
Exón7	SCLO1B1_P127_PF	TTGTATGATCACTTCCCTTTGTC	PCR y secuenciación	22
	SCLO1B1_P127_PR	CACATCAACATCCAAGCCAC	PCR y secuenciación	23
Exón8	SLCO1B1_P007_PF	TTCATTGCTGACCCTTTCTTG	PCR	24
	SLCO1B1_P007_PR	GCATCACCCACTAGGTTCTTG	PCR	25
	SLCO1B1_P007_SF	AGCCATCAAGTGCACACAAG	secuenciación	26
	SLCO1B1_P007_SR	TTTTGTTGGTTTCTCCCTGC	secuenciación	27
Exón9	SLCO1B1_P008_PF	AAAACAGCACTTACGTATGACCC	PCR y secuenciación	28
	SLCO1B1_P008_PR	TGCAACTTCAAATGCAGAGC	PCR y secuenciación	29
Exón10	SLCO1B1_P009_PF	CAAACACTGCATGTTCCAC	PCR	30
	SLCO1B1_P009_PR	TCCATCCAAGATTACAGTGGTG	PCR	31
	SLCO1B1_P009_SF	AGCAAGGGGAGGAAGAACAT	secuenciación	32
	SLCO1B1_P009_SR	TTTCTCTAAGCCTTACTTTTCCCA	secuenciación	33
Exón11	SLCO1B1_P010_PF	CAGTGAGCTGAAAGGAATGTCA	PCR	34
	SLCO1B1_P010_PR	AGGAAGTGCTGACAATGGGT	PCR	35
	SLCO1B1_P010_SF	GGCAAAGATGGAGAGCGTAA	secuenciación	36
	SLCO1B1_P010_SR	AGAAAAACCTGATTGTGCCCT	secuenciación	37
Exón12	SLCO1B1_P011_PF	GGATAATTCCTCCTCAGGGC	PCR	38
	SLCO1B1_P011_PR	TGGAATGTTATCAAATGGAGCA	PCR	39
	SLCO1B1_P011_SF	TCTGCAGAGGGTAAAAGGGA	secuenciación	40
	SLCO1B1_P011_SR	TACCCTGAGAGATGCAAGGC	secuenciación	41

(continuación)

Número de exón	Nombre	Secuencia	Uso	SEQ ID No.
Exón13	SCLO1B1_P151_PF	GGCCATTCAACTGTGAGCTT	PCR y 42 secuenciación	
	SCLO1B1_P151_PR	TAGGCCCTTCACTCTGCCTA	PCR y 43 secuenciación	
Exón14	SLCO1B1_25	TTGGGTAGATGCAGAACAAA	PCR y 44 secuenciación	
	SLCO1B1_26	TGACATGAGGAGAGTTTTGG	PCR 45	
Exon15	SLCO1B1_P014_PF	GAAGGCCAGAGGCAACTAGA	PCR 46	
	SLCO1B1_P014_PR	GTGGGAAAGCTGCAAAAGAA	PCR 47	
	SLCO1B1_P014_SF1	CGTTATGCCCAATAAAAAGAA	secuenciación 48	
	SLCO1B1_P014_SR1	AGCTCCTCCTTTTTAACCTCTACC	secuenciación 49	
	SLCO1B1_P014_SF2	GCTGGGGCAGATAGTAAAC	secuenciación 50	
	SLCO1B1_P014_SR2	GCGGCAAATGATCTAGGAAA	secuenciación 51	

**Lista de referencias**

1. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366:1267-78.
2. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA* 2003; 289:1681-90.
3. Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 2007; 370:1781-90.
4. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* 2008; 359:789-99.
5. Corsini A, Bellosta S, Davidson MH. Pharmacokinetic interactions between statins and fibrates. *Am J Cardiol* 2005; 96:44K-49K; discussion 34K-35K.
6. Law M, Rudnicka AR. Statin safety: a systematic review. *Am J Cardiol* 2006; 97:S52-S60
7. Ballantyne CM, Corsini A, Davidson MH, Holdaas H, Jacobson TA, Leitersdorf E, et al. Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. *Arch Intern Med* 2003; 163:553-64.
8. Molden E. Variability in Cytochrome P450-Mediated Metabolism of Cardiovascular Drugs: Clinical Implications and Practical Attempts to Avoid Potential Problems. *Heart Drug* 2004; 4:55-79.
9. Simonson SG, Raza A, Martin PD, Mitchell PD, Jarcho JA, Brown CD, et al. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76:167-77.
10. Mangravite LM, Thorn CF, Krauss RM. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. *Pharmacogenomics J* 2006; 6:360-74.
11. Konig J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 372:432-43.
12. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther* 2006; 112:71-105.
13. Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM, Schaefer EJ. CYP3A4 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin in primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004; 93:104-7.
14. Oh J, Ban MR, Miskie BA, Pollex RL, Hegele RA. Genetic determinants of statin intolerance. *Lipids Health Dis* 2007; 6:7

15. Morimoto K, Ueda S, Seki N, Igawa Y, Kameyama Y, Shimizu A, et al. OATP-C(OATP01B1)\*15 is associated with statin-induced myopathy in hypercholesterolemic patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2005; 77:P21-P21
- 5 16. Kim KT, Birmingham BK, Azumaya CT, Chen Y, Schneck D, Zalikowski J. Increased systemic exposure to rosuvastatin in Asian subjects residing in the United States compared to Caucasian subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2008; 83:S14 Abstract.
17. SEARCH Study Collaborative Group. Study of the effectiveness of additional reductions in cholesterol and homocysteine (SEARCH): characteristics of a randomized trial among 12064 myocardial infarction survivors. *Am Heart J* 2007; 154:815-23.e6.
- 10 18. Gunderson KL, Kuhn KM, Steemers FJ, Ng P, Murray SS, Shen R. Whole-genome genotyping of haplotype tag single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2006; 7:641-8.
19. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437:1299-320.
20. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; 38:904-9.
- 15 21. Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics* 1999; 55:997-1004.
22. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:7-22.
23. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81:559-75.
- 20 24. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447:661-78.
25. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21:263-5.
26. Sinnwell JP, Schaid DJ and Yu and Z. haplo.stats: Statistical Analysis of Haplotypes with Traits and Covariates when Linkage Phase is Ambiguous. R package version 1.3.1. [http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid\\_lab/software.cfm](http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm). 2007.
27. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2007.
- 30 28. Pasanen MK, Backman JT, Neuvonen PJ, Niemi M. Frequencies of single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide 1B1 SLCO1B1 gene in a Finnish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62:409-15.
29. Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 2001; 276:35669-75.
30. Zocor datasheet. <http://www.emc.medicines.org.uk/emc/assets/c/html/DisplayDoc.asp?DocumentID=1201>. 2007.
- 35 31. Vladutiu GD, Simmons Z, Isackson PJ, Tarnopolsky M, Peltier WL, Barboi AC, et al. Genetic risk factors associated with lipid-lowering drug-induced myopathies. *Muscle Nerve* 2006; 34:153-62.

**Listado de secuencias**

- <110> Isis Innovation Ltd
- <120> METODOS DE DIAGNÓSTICO
- 40 <130> 13492WO
- <150> GB 0803833.3
- <151> 2008-02-29
- <150> GB 0812414.1
- <151> 2008-07-07
- 45 <160> 51

<170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 1  
 aatggtcttg cagttaattg gg 22  
 10 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 2  
 tccctcacc ctgtatcaaa ct 22  
 <210> 3  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 3  
 25 tggcaactgg agtgaactct t 21  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 4  
 ttccctctac CTccaccctt 20  
 <210> 5  
 35 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 5  
 tctactctgt gcaagggct 20  
 5 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 6  
 tccagcattg acctagcaga 20  
 <210> 7  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 7  
 20 tcgtagatcaa CTcaaaacca 20  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 8  
 tgttttcag ctggcttct 20  
 <210> 9  
 30 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 35 <400> 9  
 ggtctaactg aggtgctct gaa 23  
 <210> 10

<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
5 <223> Secuencia Artificial  
<400> 10  
agaatgtact gccactcccc t 21  
<210> 11  
<211> 20  
10 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia Artificial  
<400> 11  
15 tattgccaaa tgcctgtga 20  
<210> 12  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
20 <220>  
<223> Secuencia Artificial  
<400> 12  
atgccatggt ttattcttt CTa 23  
<210> 13  
25 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia Artificial  
30 <400> 13  
taagtttctc ccccatgtgc 20  
<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
35 <213> Artificial  
<220>  
<223> Secuencia Artificial

<400> 14  
 tgtcttgag ggaaggcact        20  
 <210> 15  
 <211> 21  
 5    <212> ADN  
      <213> Artificial  
      <220>  
      <223> Secuencia Artificial  
      <400> 15  
 10   gcttcagtga aatgatggga a        21  
      <210> 16  
      <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial  
 15   <220>  
      <223> Secuencia Artificial  
      <400> 16  
      ataaccact tagcctgggg        20  
      <210> 17  
 20   <211> 20  
      <212> ADN  
      <213> Artificial  
      <220>  
      <223> Secuencia Artificial  
 25   <400> 17  
      gctgcctgtg tgttctcaaa        20  
      <210> 18  
      <211> 20  
      <212> ADN  
 30   <213> Artificial  
      <220>  
      <223> Secuencia Artificial  
      <400> 18  
      gggaagata atggtgcaaa        20  
 35   <210> 19  
      <211> 20  
      <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 19  
 5 cggcaggttt atcatccagt 20  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 20  
 ttgtcaaagt ttgcaaagtg 20  
 <210> 21  
 15 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 20 <400> 21  
 gccagaatg catggttctt 20  
 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 22  
 ttgtatgatc acttccctt tgtc 24  
 30 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 23  
 cacatcaaca CTcaagccac 20

<210> 24  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 24  
 ttcattgctg acccttctt g 21  
 <210> 25  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 15 <400> 25  
 gcatcaccca ctaggttctt g 21  
 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 26  
 agccatcaag tgcacacaag 20  
 25 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 27  
 tttgttgg ttctcctgc 20  
 <210> 28  
 <211> 23  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> Secuencia Artificial  
 <400> 28  
 aaaacagcac ttacgtatga ccc 23  
 <210> 29  
 5 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 10 <400> 29  
 tgcaactca aatgcagagc 20  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 30  
 caaacactgc atgtccac 20  
 20 <210> 31  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 31  
 tccatccaag attacagtgg tg 22  
 <210> 32  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 32  
 35 agcaagggga ggaagaacat 20  
 <210> 33  
 <211> 24

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 5 <400> 33  
 tttctctaag ccttactttt ccca 24  
 <210> 34  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 34  
 cagtgagctg aaaggaatgt ca 22  
 15 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 35  
 aggaagtgt gacaatgggt 20  
 <210> 36  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 36  
 30 ggcaaagatg gagagcgtaa 20  
 <210> 37  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 37

agaaaaacct gatttgccc t      21  
 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 38  
 ggataattcc CTctcagggc      20  
 10 <210> 39  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 39  
 tggaatgta CTaaatggag ca      22  
 <210> 40  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 40  
 25 tctgcagagg gtaaaagga      20  
 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 41  
 taccctgaga gatgcaaggc      20  
 <210> 42  
 35 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 42  
 ggccattcaa ctgtgagctt      20  
 5 <210> 43  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Artificial  
    <220>  
 10 <223> Secuencia Artificial  
    <400> 43  
    taggcccttc actctgccta      20  
    <210> 44  
    <211> 20  
 15 <212> ADN  
    <213> Artificial  
    <220>  
    <223> Secuencia Artificial  
    <400> 44  
 20 ttggtagat gcagaacaaa      20  
    <210> 45  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Artificial  
 25 <220>  
    <223> Secuencia Artificial  
    <400> 45  
    tgacatgagg agagtttgg      20  
    <210> 46  
 30 <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Artificial  
    <220>  
    <223> Secuencia Artificial  
 35 <400> 46  
    gaaggccaga ggcaactaga      20  
    <210> 47

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 47  
 gtgggaaagc tgcaaaagaa 20  
 <210> 48  
 <211> 22  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 48  
 15 cgttatgcc caataaaaag aa 22  
 <210> 49  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 <400> 49  
 agctcctct tttaacctc tacc 24  
 <210> 50  
 25 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial  
 30 <400> 50  
 gctggggcag atagtgaaac 20  
 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia Artificial

# ES 2 744 797 T3

<400> 51

gcggcaaatg atctaggaaa 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de determinación de una dosis adecuada para un individuo que necesita tratamiento con una estatina, que comprende

5 i) determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos en el gen SLCO1B1 en una muestra biológica de un individuo; y

10 ii) determinar una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia al genotipo de uno o más polimorfismos, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo heterocigoto u homocigoto de alto riesgo y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo, en el que el genotipo de alto riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas y en el que el genotipo de bajo riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un menor riesgo de miopatía inducida por estatinas,

en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en los SNP rs4149056, rs4363657, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs11045879, rs7969341, rs11045885, rs12369881 y rs12366582; y

15 en el que,

un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

20 un genotipo de alto riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo AA;

un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo TT;

25 un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

30 2. Un procedimiento para reducir el riesgo de miopatía en un individuo durante el tratamiento con una estatina, que comprende

i) determinar la presencia o ausencia de i) genotipo de "alto riesgo" de uno o más polimorfismos que están asociados con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas o ii) genotipo de "bajo riesgo" de uno o más polimorfismos que están asociados con disminución del riesgo de miopatía inducida por estatinas;

35 ii) clasificar al individuo según su susceptibilidad a la miopatía inducida por estatinas, por referencia a la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos detectados en la etapa i); y

iii) determinar una dosis adecuada para el tratamiento con estatinas por referencia a la susceptibilidad del individuo a la miopatía inducida por estatinas determinada en el paso ii), lo que reduce el riesgo de miopatía en un individuo durante el tratamiento,

40 en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en rs4149056, rs4363657, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs11045879, rs7969341, rs11045885, rs12369881 y rs12366582; y

un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

45 un genotipo de alto riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo AA;

un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo TT;

un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

5 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el procedimiento comprende determinar si el individuo tiene un genotipo homocigoto o heterocigoto para una citosina (C) o una timina (T) en rs4149056.

4. Una estatina para su uso en el tratamiento de un individuo que necesita tratamiento con una estatina, comprendiendo el tratamiento los pasos de:

10 i) determinar si el genotipo del individuo es heterocigoto u homocigoto para uno o más polimorfismos en el gen SLC11B1 en una muestra biológica de un individuo;

ii) clasificar al individuo según su genotipo en uno o más polimorfismos según lo determinado en el paso i); y

15 iii) administrar una dosis de una estatina, por lo que una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo heterocigoto u homocigoto de alto riesgo y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo homocigoto de bajo riesgo, en el que el genotipo de alto riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un mayor riesgo de miopatía inducida por estatinas y en el que el genotipo de bajo riesgo de uno o más polimorfismos se asocia con un menor riesgo de miopatía inducida por estatinas,

en el que el uno o más polimorfismos se seleccionan del grupo que consiste en los SNP rs4149056, rs4363657, rs1871395, rs12317268, rs2900478, rs4149100, rs4149081, rs11045879, rs7969341, rs11045885, rs12369881 y rs12366582; y

20 en el que,

un genotipo de alto riesgo en rs4149056 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149056 se define como un genotipo TT;

25 un genotipo de alto riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo GG o GA y un genotipo de bajo riesgo en rs1871395, rs12317268, rs7969341, rs1045885 o rs12366582 se define como un genotipo AA;

un genotipo de alto riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo AA o AG, y un genotipo de bajo riesgo en rs4149081 o rs12369881 se define como un genotipo GG;

un genotipo de alto riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo CC o CT, y un genotipo de bajo riesgo en rs4363657 o rs11045879 se define como un genotipo TT;

30 un genotipo de alto riesgo en rs2900478 se define como un genotipo AA o AT, y un genotipo de bajo riesgo en rs2900478 se define como un genotipo TT; y

un genotipo de alto riesgo en rs4149100 se define como un genotipo que es homocigoto para una eliminación o heterocigoto para una eliminación, y un genotipo de bajo riesgo rs4149100 se define como un genotipo AA.

35 5. La estatina para su uso según la reivindicación 4, en la que el tratamiento comprende determinar si el individuo tiene un genotipo homocigoto o heterocigoto para una citosina (C) o una timina (T) en rs4149056.

6. La estatina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde el uno o más polimorfismos es SNP rs4149056, y en donde una dosis estándar de una estatina es adecuada para un individuo con un genotipo CC o CT, y una dosis más alta es adecuada para un individuo con un genotipo TT.

40 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la estatina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la estatina es lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, pravastatina y rosuvastatina.

8. El procedimiento según la reivindicación 7 o la estatina para su uso según la reivindicación 7, en el que la estatina es simvastatina, y en el que una dosis estándar es de 20 o 40 mg al día, y una dosis más alta es de 80 mg al día.

45 9. El procedimiento según la reivindicación 7 o la estatina para su uso según la reivindicación 7, en el que la estatina es atorvastatina, y en el que una dosis estándar es de 10-20 mg al día, y una dosis más alta es de 20-40 mg al día.

10. El procedimiento según la reivindicación 7 o la estatina para su uso según la reivindicación 7, en el que la estatina es fluvastatina, y en el que una dosis estándar es de 40 a 80 mg por día, y una dosis más alta es de 80 a 160 mg por día.

11. El procedimiento según la reivindicación 7 o la estatina para su uso según la reivindicación 7, en el que la estatina es lovastatina, y en el que una dosis estándar es de 40 mg al día, y una dosis más alta es de 80 mg al día.
12. El procedimiento según la reivindicación 7 o la estatina para su uso según la reivindicación 7, en el que la estatina es pravastatina, y en el que una dosis estándar es de 40 mg al día, y una dosis más alta es de 80 mg al día.
- 5 13. El procedimiento según la reivindicación 7 o la estatina para su uso según la reivindicación 7, en el que la estatina es rosuvastatina, y en el que una dosis estándar es de 10 mg al día y una dosis más alta es de 20 mg al día.
- 10 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la estatina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en el que el individuo tiene un mayor riesgo de miopatía debido al uso concomitante de fármacos que retardan el aclaramiento de estatinas, o debido a la disminución de la captación hepática o del aclaramiento renal de las estatinas debido a variantes genéticas o enfermedades.

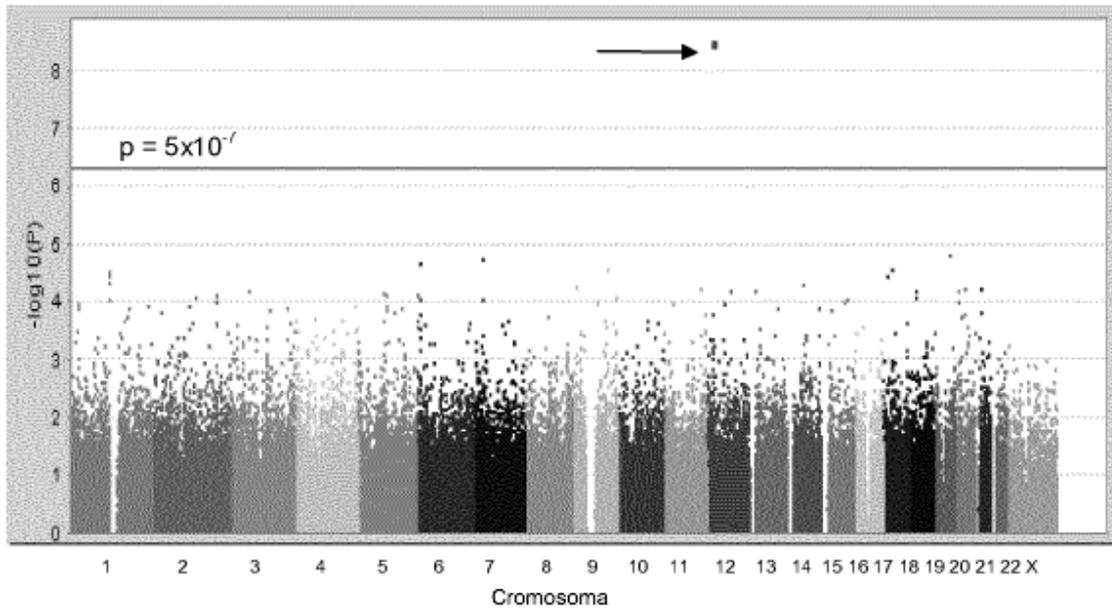


FIGURA 1

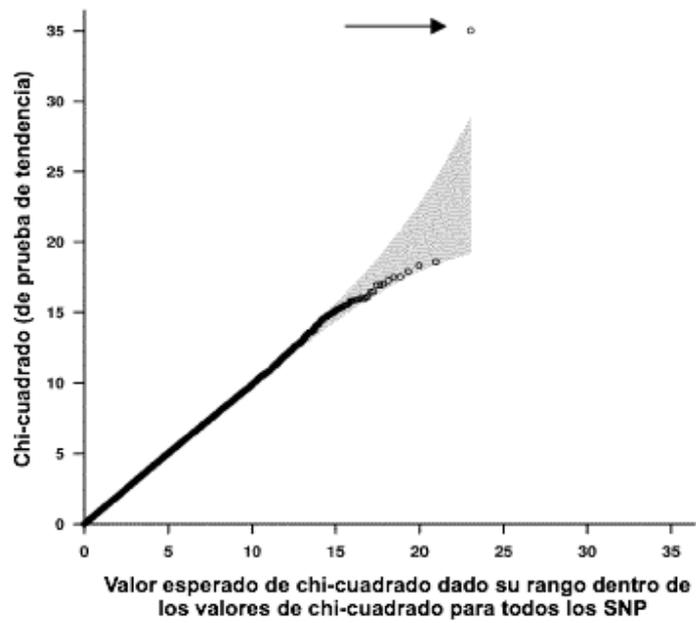


FIGURA 2

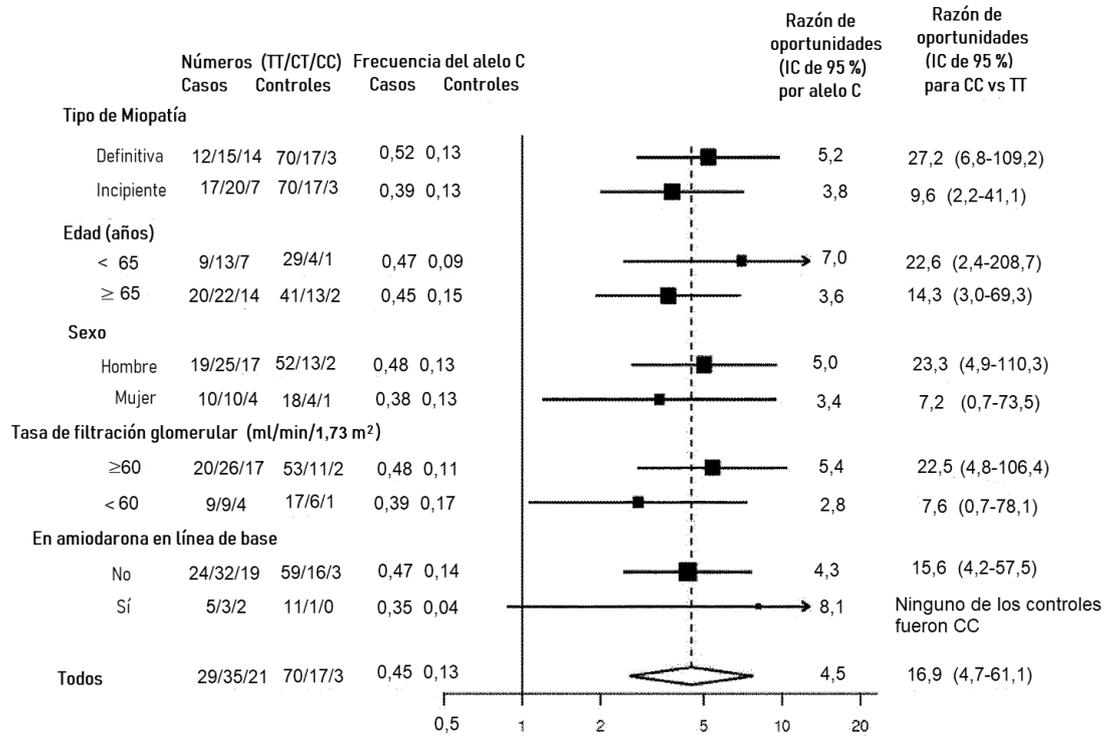


FIGURA 3

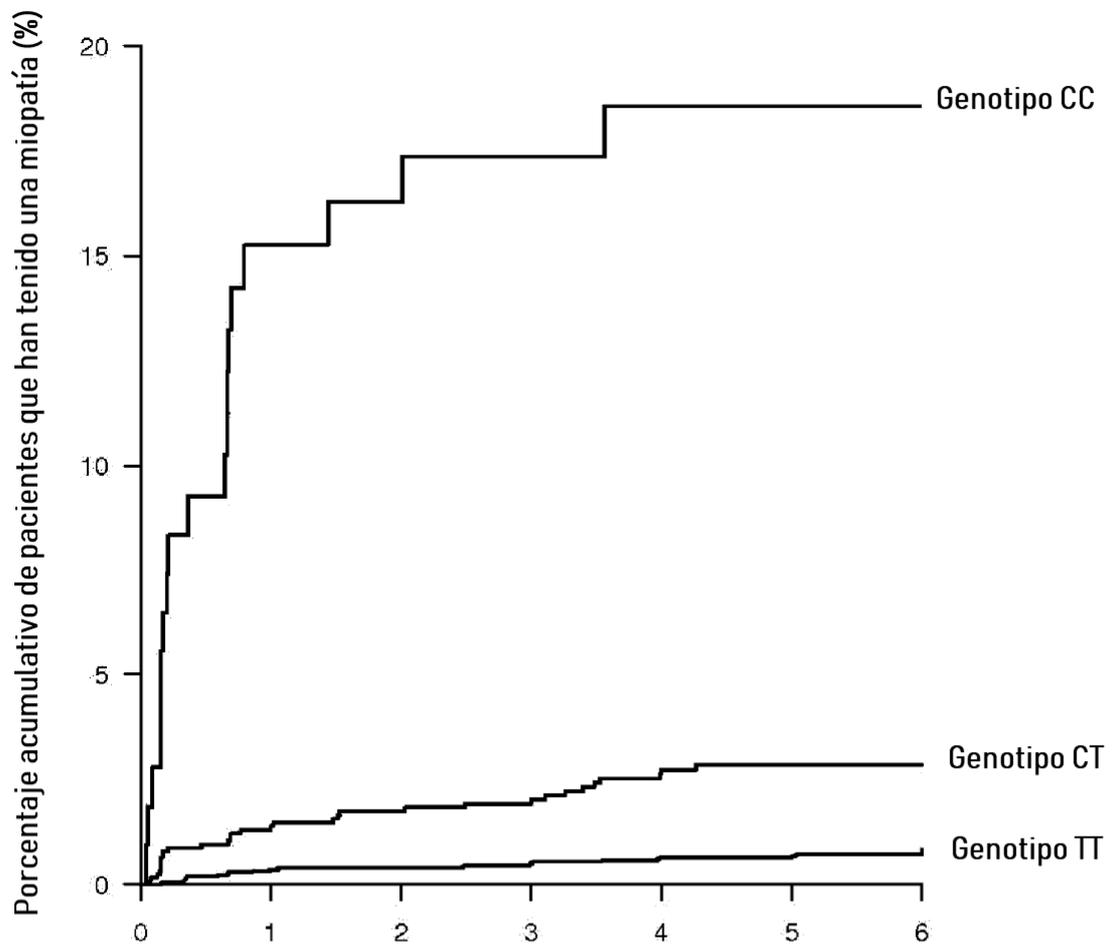


FIGURA 4