

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 764**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

A61K 31/713 (2006.01)

G16B 30/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012 E 17159320 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3241911**

54 Título: **Identificación de trombosis o riesgo de hemorragia en un individuo con y sin terapia antiplaquetaria**

30 Prioridad:

14.05.2011 EP 11166142

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

14.07.2020

73 Titular/es:

**DEVENISH NUTRITION LIMITED (100.0%)
Lagan House, 19 Clarendon Road
Belfast BT1 3BG, GB**

72 Inventor/es:

**STANTON, ALICE y
MCCARTHY, NINA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 773 764 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

Identificación de trombosis o riesgo de hemorragia en un individuo con y sin terapia antiplaquetaria

5 **Introducción**

La invención se refiere a un procedimiento para identificar a un individuo con mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico o un episodio hemorrágico grave seleccionado entre hemorragia cerebral y hemorragia gastrointestinal, como se reivindica. La invención también se refiere a un procedimiento de identificación de individuos adecuados para el tratamiento con una dosis alta de terapia antiplaquetaria o con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria (simple o dual) en la prevención de episodios cardiovasculares (primarios o secundarios), o es probable que sufra una complicación hemorrágica significativa cuando se somete a un tratamiento con medicamentos que influyen en la hemostasia, o es probable que sufra una complicación trombótica cuando se le receta un antagonista de COX2 o un agonista de PPAR γ , como se reivindica.

15 El tromboxano se libera de las plaquetas activadas y desempeña un papel clave en la prevención de hemorragia excesiva al promover la formación de tapones de plaquetas (trombosis) cuando se lesionan los vasos sanguíneos. Sin embargo, las trombosis plaquetarias, al bloquear los vasos sanguíneos arteriales en la circulación coronaria y cerebral, son la etapa final en la mayoría de los ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, respectivamente. Por lo tanto, uno de los medicamentos antiplaquetarios más comúnmente recetados, la aspirina, tiene sus efectos beneficiosos a través de la inhibición de la formación de tromboxano en las plaquetas. Como era de esperar, el principal efecto adverso de los medicamentos antiplaquetarios como la aspirina es la hemorragia excesiva.

20 El tromboxano, después de la liberación de las plaquetas, se metaboliza rápidamente a un metabolito inactivo, el 11-deshidro-tromboxano B2 (TxM) que se excreta en la orina. Los niveles urinarios de TxM sirven como una medida del recambio de tromboxano y la tendencia trombótica. En consonancia con la formación o el recambio excesivo de tromboxano que desempeñan un papel causal en los episodios cardiovasculares, recientemente se ha demostrado que los altos niveles de TxM urinario al inicio del estudio, con y sin terapia antiplaquetaria (aspirina), predicen ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares en una gran cantidad de estudios epidemiológicos y ensayos clínicos.

30 Actualmente, la aspirina y otros medicamentos antiplaquetarios se recetan ampliamente para proporcionar protección contra los episodios aterotrombóticos. La hemorragia es el efecto adverso más grave de la aspirina a largo plazo y otras terapias antiplaquetarias, con hemorragia cerebral (accidente cerebrovascular hemorrágico, hemorragia intracraneal) y hemorragia gastrointestinal considerados episodios graves. Por lo tanto, la prescripción de la terapia antiplaquetaria se guía actualmente por los riesgos relativos de episodios aterotrombóticos y hemorragia, como se describe a continuación: Prevención Secundaria: En individuos donde el riesgo de un episodio aterotrombótico es grande (ataque cardíaco previo o accidente cerebrovascular isquémico), se ha demostrado claramente que los beneficios protectores de la terapia antiplaquetaria única (más comúnmente aspirina) superan los riesgos de hemorragia (BMJ 2002; 324; 71)

40 Además, mientras que la terapia antiplaquetaria dual (antagonistas de la aspirina y del receptor de ADP como clopidogrel y prasugrel) ha demostrado ser beneficiosa en el tratamiento del infarto agudo de miocardio y también en pacientes sometidos a angioplastia, la terapia antiplaquetaria dual en pacientes con enfermedad cardiovascular estable no reduce los resultados cardiovasculares adversos en comparación con la aspirina sola, y se ha asociado con un mayor riesgo de hemorragia (N. Engl J Med. 2006; 354: 1706-1717).

45 Prevención primaria: En individuos que solo tienen uno o varios factores de riesgo cardiovascular (presión arterial alta, tabaquismo, diabetes, colesterol alto u obesidad) y que aún no han sufrido un episodio morbido, la situación no está clara. En este grupo, si bien la aspirina reduce la cantidad de ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, la aspirina causa casi tantos episodios hemorrágicos significativos (accidentes cerebrovasculares hemorrágicos y hemorragias gastrointestinales graves que amenazan la vida) Lancet 2009; 373; 1849-60)

50 El documento WO2005030993 describe un procedimiento in vitro para determinar el riesgo de desarrollar trombosis mediante la identificación de polimorfismos del gen EPCR, donde la presencia de G en la posición 1651, C en la posición 3610, A en la posición 4216 o G en la posición 6936 es indicativo de un mayor riesgo para desarrollar trombosis.

55 Actualmente no se han establecido evaluaciones de la tendencia trombótica basal o del riesgo de hemorragia con la terapia antiplaquetaria en la práctica clínica. La cuantificación precisa de la TxM urinaria es compleja y costosa, y sigue siendo una herramienta de investigación exclusiva. La conclusión de una comparación reciente de las pruebas de función plaquetaria disponibles actualmente fue que las precisiones predictivas de los resultados cardiovasculares fueron, en el mejor de los casos, modestas, y que ninguna prueba proporcionó información pronóstica precisa sobre los riesgos de

hemorragia (JAMA 2010; 303: 754-762). Los problemas adicionales incluían una reproducibilidad deficiente, un tiempo de procesamiento de muestra prolongado, la necesidad de técnicos especializados y/o gastos.

En Irlanda, y en la mayor parte del mundo desarrollado, más del 50% de los mayores de 45 años tienen al menos 2 factores de riesgo cardiovascular importantes. El hecho de que una gran cantidad de ensayos clínicos en curso actualmente estén buscando identificar cuáles de estos pacientes obtienen más beneficios que daños de la terapia antiplaquetaria, demuestra que este es un problema clínico actual importante, que está atrayendo fondos de la industria farmacéutica y autoridades de subvenciones gubernamentales. Estos incluyen el Estudio ARRIVE (Aspirina para reducir el riesgo de episodios vasculares iniciales: un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, multicéntrico, de grupos paralelos para evaluar la eficacia (reducción de episodios de enfermedades cardiovasculares) y la seguridad de 100 mg de acetilsalicílico con recubrimiento entérico ácido en 12.000 pacientes con riesgo moderado de enfermedad cardiovascular. Estudio financiado por Bayer Healthcare AG que cuesta al menos 36 millones de euros) y el Proyecto de prevención primaria japonés - JPPP (un ensayo aleatorizado, abierto y controlado de aspirina versus ninguna aspirina en 14.466 pacientes con múltiples factores de riesgo para episodios vasculares. Financiado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón y la Fundación Waksman de Japón Inc.)

Es un objetivo de la invención superar al menos uno de los problemas mencionados anteriormente.

Declaraciones de la invención

El solicitante ha descubierto que la presencia de ciertas variantes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) como se define en las reivindicaciones está significativamente asociada con una mayor TxM, y la asociación de TxM con los SNP está impulsada casi totalmente por los pacientes que no toman aspirina, mientras que existe poca o ninguna asociación estadísticamente significativa entre cualquiera de estos SNP con TxM entre sujetos aspirinados.

Las variantes de SNP empleadas en la presente invención se encuentran en el gen CNTN4.

PPARGC1 β codifica el coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1 β . Mediante la formación de complejos multiméricos con el receptor nuclear, el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), PPARGC1 β influye en la actividad transcripcional y la expresión génica en una variedad de vías metabólicas. Tanto PPARGC1 β como PPAR γ se expresan en tejido hematopoyético, pero no se han estudiado los efectos de la activación de PPAR γ en la formación de plaquetas por megacariocitos o en la trombosis.

CNTN4 codifica contactina 4, un miembro de la familia de inmunoglobulinas contactina. Las contactinas son moléculas de adhesión celular asociadas al axón que funcionan en la formación y plasticidad de la red neuronal. La Contactina 4 se expresa principalmente en el cerebro, aunque se han demostrado niveles más bajos de expresión en otros tejidos. Hasta ahora, no hay datos que sugieran un papel para la contactina 4 en la trombosis.

LZTS1 codifica cremallera de leucina, supuesto supresor tumoral 1, una proteína supresora de tumores que se expresa de forma ubicua en los tejidos normales. Está involucrado en la regulación del crecimiento celular y puede estabilizar el complejo activo CDC2-ciclina B1 y prevenir así la proliferación celular incontrolada. De nuevo, hasta ahora no hay datos que sugieran un papel para este gen en la trombosis.

KCNE4 codifica el canal dependiente de voltaje de potasio, familia relacionada con Isk, miembro 4. Este miembro es una proteína de membrana tipo I, una proteína auxiliar que se ensambla como una subunidad beta con un complejo de canales de potasio dependiente de voltaje de subunidades alfa que forman poros, modulando la cinética de activación y mejorando la estabilidad del complejo multimérico. Poco se sabe sobre la función de este canal de potasio específicamente; los canales de potasio activados por voltaje tienen diversas funciones, incluida la regulación de la liberación de neurotransmisores, la frecuencia cardíaca, la secreción de insulina, la excitabilidad neuronal, el transporte de electrolitos epiteliales, la contracción del músculo liso y el volumen celular. Este gen se expresa de manera prominente en el embrión y en el útero adulto, y no se sabe que desempeñe un papel en la trombosis.

Los hallazgos anteriores ilustran claramente que las variantes genéticas en PPARGC1 β CNTN4, LZTS1 y KCNE4 influyen fuertemente en la formación de tromboxano: el transporte de uno de estos SNP se asoció con un incremento en TxM de magnitud similar a la disminución en TxM asociada con la toma de aspirina. Además, dado que las asociaciones solo se observaron en pacientes sin aspirina, parece que la aspirina bloquea completamente o en gran parte el exceso de producción de tromboxano en los portadores de las variantes genéticas PPARGC1 β CNTN4, LZTS1 y KCNE4.

Dada la diferencia muy dramática en la TxM urinaria según el genotipo PPARGC1 β , CNTN4, LZTS1 y KCNE4, la identificación de las variantes PPARGC1 β CNTN4, LZTS1 y KCNE4 permite la identificación de sujetos con mayor y menor riesgo de trombosis y hemorragia. Permite la identificación de aquellos sujetos que obtendrán el mayor beneficio de la terapia antiplaquetaria (portadores de las variantes genéticas protrombóticas PPARGC1 β CNTN4, LZTS1 y KCNE4),

y también aquellos que tienen más probabilidades de sufrir complicaciones hemorrágicas cuando se recetan medicamentos antiplaquetarios y también otros medicamentos que influyen en la hemostasia, tales como los antiinflamatorios no esteroideos y los anticoagulantes (no portadores).

5 Otras aplicaciones para el genotipado PPARGC1 β , CNTN4, LZTS1 y KCNE4 incluyen la identificación de sujetos con mayor probabilidad de sufrir efectos secundarios trombóticos con fármacos ampliamente utilizados como inhibidores de COX2 y glitazonas; estos episodios adversos hasta ahora impredecibles han llevado a la retirada del mercado de algunos bloqueadores como la nimesulida oral (el inhibidor de la COX2 ahora solo está disponible como gel tópico) y la emisión de una advertencia de recuadro negro para la rosiglitazona (glitazona). Los antagonistas de COX2 inhiben la formación de prostaciclina (antagonista natural del tromboxano) en mayor medida que la formación de tromboxano y, por lo tanto, el uso de antagonistas de COX2 en los portadores de las variantes genéticas PPARGC1 β CNTN4, LZTS1 y KCNE4 protrombóticas sería más probable que conduzca a episodios trombóticos. Las glitazonas, como la rosiglitazona, son agonistas de PPAR γ y, por lo tanto, su uso en portadores de variantes genéticas de PPARGC1 β protrombóticas puede ser la explicación del exceso de episodios trombóticos.

15 La invención proporciona un procedimiento para la identificación de un individuo con mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, que comprende una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 se correlaciona con el individuo que tiene un mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, y donde la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con el individuo que tiene un mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico.

20 La invención también proporciona un procedimiento para la identificación de un individuo con mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave seleccionado entre hemorragia cerebral y hemorragia gastrointestinal, que comprende una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la ausencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 se correlaciona con que el individuo esté en mayor riesgo de un episodio hemorrágico mayor, y donde la presencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con el individuo en aumento del riesgo de hemorragia grave. seleccionado de hemorragia cerebral y hemorragia gastrointestinal.

30 La invención también proporciona un procedimiento para identificar a un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria única en la prevención primaria de episodios cardiovasculares, el procedimiento comprende una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO: 25 se correlaciona con que el individuo sea adecuado para la terapia antiplaquetaria única.

35 La invención también proporciona un procedimiento para identificar a un individuo adecuado para el tratamiento con una dosis alta de terapia antiplaquetaria, comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO: 25 se correlaciona con que el individuo sea adecuado para una dosis alta de terapia antiplaquetaria.

45 La invención también proporciona un procedimiento para identificar a un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria dual en la prevención secundaria de episodios cardiovasculares, comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25 donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO: 25 se correlaciona con que el individuo sea adecuado para la terapia antiplaquetaria dual.

50 La invención también proporciona un procedimiento para identificar a un individuo que pueda sufrir una complicación hemorrágica significativa cuando se somete a un tratamiento con medicamentos que influyen en la hemostasia, comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25 donde la ausencia de variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 o la presencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO: 25 se correlaciona con la probabilidad de que el individuo sufra una complicación hemorrágica significativa cuando se somete a tratamiento con un medicamento que influye en la hemostasia.

60 La invención también proporciona un procedimiento para identificar a un individuo que pueda sufrir una complicación trombótica cuando se le recete un antagonista de COX2 o un agonista de PPAR γ , comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante

alélica menor de la SECUENCIA ID NO: 25 se correlaciona con la probabilidad de que el individuo sufra una complicación trombótica cuando se le receta un antagonista de COX2 o un agonista de PPARy.

5 También se describe un procedimiento para la prevención o el tratamiento de trombosis o un episodio aterotrombótico en un individuo, procedimiento que emplea una etapa para identificar a un individuo con mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico según un procedimiento de la reivindicación 1, donde un individuo identificado como que está en mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico se trata con un agente antiplaquetario.

10 También se describe un procedimiento para la prevención de un episodio hemorrágico grave en un individuo, procedimiento que emplea una etapa para identificar a un individuo con mayor riesgo de tener un episodio de hemorragia grave según un procedimiento de la reivindicación 2, donde un individuo identificado como que está en riesgo incrementado de tener un episodio hemorrágico grave se elimina de la terapia antiplaquetaria.

15 También se describe un procedimiento para la prevención primaria de un episodio cardiovascular en un individuo, procedimiento que emplea una etapa para identificar a un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria única en la prevención primaria de episodios cardiovasculares según la reivindicación 3, donde el individuo identificado se trata con un único agente antiplaquetario.

20 También se describe un procedimiento de tratamiento de un individuo con terapia antiplaquetaria en la prevención secundaria de episodios cardiovasculares, procedimiento que emplea una etapa de identificación de un individuo adecuado para el tratamiento con una dosis alta de terapia antiplaquetaria según un procedimiento de la reivindicación 4, donde un individuo identificado se trata con una dosis alta de agente antiplaquetario.

25 También se describe un procedimiento para la prevención secundaria de un episodio cardiovascular en un individuo, procedimiento que emplea una etapa para identificar a un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria dual en la prevención secundaria de episodios cardiovasculares según un procedimiento de la reivindicación 5, donde un individuo identificado se trata con una terapia antiplaquetaria dual.

30 Los procedimientos, ensayos y sistemas de la invención emplean 2 variantes Los procedimientos, ensayos o sistemas de la invención emplean 2 variantes alélicas menores seleccionadas de la SECUENCIA ID NO: 22 y 25. Se emplean las 2 variantes alélicas menores seleccionadas de la SECUENCIA ID NO: 22 y 25. En general, el uso de dos o más variantes en los procedimientos/ensayos y sistemas de la invención proporciona un diagnóstico más potente.

35 También se describe un programa informático que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador realice el procedimiento de la invención.

40 La invención también proporciona un ensayo para identificar a un sujeto que tiene una mayor probabilidad de sufrir un episodio trombótico o aterotrombótico que comprende: (a) identificar al menos un alelo de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en SECUENCIA ID NO 22 y 25 en una muestra biológica obtenida de un sujeto; y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 y la variante alélica principal de la SECUENCIA ID NO 25, y si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo que identifican al sujeto con una mayor probabilidad de sufrir un episodio trombótico o aterotrombótico.

45 La invención también proporciona un ensayo para identificar a un sujeto que tiene una mayor probabilidad de sufrir un episodio hemorrágico grave que comprende: (a) identificar al menos un alelo de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID NO 22 y 25 en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene un mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave; y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas principales de la SECUENCIA ID NO 22 y la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25, y si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo que identifican al sujeto como que tiene una mayor probabilidad de sufrir un episodio hemorrágico grave.

50 La invención también proporciona un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento primario o secundario para un sujeto con mayor riesgo de trombosis o episodio aterotrombótico que comprende: (a) someter una muestra de prueba del sujeto a al menos un análisis para determinar los alelos de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID NO 22 y 25 y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de los alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 y la variante alélica principal de la SECUENCIA ID NO 25, y si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo, seleccionar entonces una terapia antiplaquetaria única como régimen de tratamiento en la prevención primaria de un episodio cardiovascular o terapia antiplaquetaria dual como régimen de tratamiento en la prevención secundaria de un episodio cardiovascular.

La invención también proporciona un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento para un individuo con mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de prueba del sujeto a al menos un análisis para determinar los alelos de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID NO 22 y 25 y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de los alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 y la variante alélica principal de la SECUENCIA ID NO 25, y si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo, seleccionar entonces una dosis alta de terapia antiplaquetaria.

La invención también proporciona un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento para un individuo sometido a tratamiento con un medicamento que influye en la hemostasia: (a) someter una muestra de prueba del sujeto a al menos un análisis para determinar los alelos de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID NO 22 y 25 y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de los alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas principales de la SECUENCIA ID NO 22 24 y la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25, y si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo, seleccionar entonces un tratamiento que no incluya un agente antiplaquetario.

En los ensayos de la invención, la etapa de comparación se realiza preferentemente con una máquina no humana, por ejemplo, un ordenador.

También se describe un sistema para obtener datos de al menos una muestra de prueba obtenida de al menos un individuo, comprendiendo el sistema:

- un módulo de determinación configurado para recibir al menos una muestra de prueba y realizar al menos un análisis de prueba en la muestra de prueba para determinar la presencia o ausencia de una o más variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO: 22 y 25

- opcionalmente, un sistema de almacenamiento para almacenar datos de variantes alélicas generados por el sistema de determinación; y

- un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en parte en la salida de datos de dicho módulo de determinación, donde el contenido comprende una señal indicativa de la presencia o ausencia de al menos una de las variantes alélicas menores de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25.

Típicamente, el sistema es para identificar el riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico de un individuo, en el cual el sistema comprende un módulo de correlación para correlacionar datos de variantes alélicas del módulo de determinación con riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con el individuo que tiene un mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, y donde el módulo de visualización muestra un contenido basado en parte en los datos del sistema de correlación, comprendiendo el contenido opcionalmente una señal indicativa del riesgo individual de trombosis o un episodio aterotrombótico.

Típicamente, el sistema es para identificar el riesgo de un individuo de un episodio hemorrágico grave, en el que el sistema comprende un módulo de correlación para correlacionar datos de variantes alélicas del módulo de determinación con riesgo de un episodio hemorrágico grave, donde la ausencia de variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 o la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo esté en mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave, y donde el módulo de visualización muestra un contenido basado en parte en los datos del sistema de correlación, comprendiendo el contenido opcionalmente una señal indicativa del riesgo individual de un episodio hemorrágico grave.

Típicamente, el sistema es para realizar un procedimiento para la identificación de un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria única en la prevención primaria de episodios cardiovasculares o la terapia antiplaquetaria dual en el tratamiento secundario de episodios cardiovasculares, en el cual el sistema comprende un módulo de correlación para correlacionar datos de variantes alélicas del módulo de determinación con probabilidad de que el individuo obtenga un beneficio de la terapia antiplaquetaria simple o la terapia antiplaquetaria dual, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con la probabilidad de que el individuo obtenga un beneficio de la terapia antiplaquetaria única en la prevención primaria de episodios cardiovasculares o la terapia antiplaquetaria dual en el tratamiento secundario de episodios cardiovasculares, y donde el módulo de visualización muestra un contenido basado en parte en los datos del sistema de correlación, comprendiendo el contenido opcionalmente una señal indicativa de la probabilidad de beneficio individual de la terapia antiplaquetaria individual en la prevención primaria de episodios cardiovasculares o la terapia antiplaquetaria dual en el tratamiento secundario de episodios cardiovasculares.

Típicamente, el sistema es para identificar un régimen de tratamiento para un individuo en riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, en el que el sistema comprende un módulo de correlación para correlacionar datos de variantes alélicas del módulo de determinación con un régimen de tratamiento adecuado, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo sea adecuado para el tratamiento con una dosis alta de terapia antiplaquetaria, y donde el módulo de visualización muestra un contenido basado en parte en los datos del sistema de correlación, comprendiendo el contenido opcionalmente una señal indicativa de un régimen de tratamiento adecuado para el individuo.

Típicamente, el sistema es para identificar a un individuo en riesgo de sufrir una complicación hemorrágica significativa cuando se somete a un tratamiento con medicamentos que influyen en la hemostasia, en el que el sistema comprende un módulo de correlación para correlacionar datos de variantes alélicas del módulo de determinación con riesgo de un episodio hemorrágico significativo, donde la ausencia de variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 o la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo esté en mayor riesgo de una complicación hemorrágica significativa, y donde el módulo de visualización muestra un contenido basado en parte en los datos del sistema de correlación, comprendiendo el contenido opcionalmente una señal indicativa del riesgo de los individuos de sufrir una complicación hemorrágica significativa cuando se someten a tratamiento con medicamentos que influyen en la hemostasia.

Típicamente, el sistema es para identificar el riesgo de que un individuo sufra una complicación trombótica cuando se le prescribe un antagonista de COX2 o un agonista de PPAR γ , en el que el sistema comprende un módulo de correlación para correlacionar datos de variantes alélicas del módulo de determinación con riesgo de una complicación trombótica, donde la presencia de una variante alélica menor de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25 o la ausencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con el riesgo de una complicación trombótica, y donde el módulo de visualización muestra un contenido basado en parte en los datos del sistema de correlación, comprendiendo el contenido opcionalmente una señal indicativa de riesgo de que el individuo sufra una complicación trombótica.

Idealmente, el sistema de determinación comprende un aparato de PCR.

También se describe un antagonista de PPARGC1 β para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno trombótico o hemorrágico arterial.

También se describe un agonista de PPARGC1 β para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno trombótico o hemorrágico arterial.

Preferentemente, el antagonista de PPARGC1 β es una molécula de siRNA.

También se describe un kit o dispositivo capaz de identificar una variante alélica seleccionada de los polimorfismos de un solo nucleótido de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25 para usar en la identificación de un individuo con mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, o un episodio hemorrágico grave.

También se describe un kit o dispositivo capaz de identificar una variante alélica seleccionada de los polimorfismos de un solo nucleótido de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25 para usar en (a) identificación de un individuo adecuado para el tratamiento mediante terapia antiplaquetaria (b) un adecuado régimen de tratamiento para un individuo con riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un ensayo/procedimiento/sistema para identificar individuos que tienen tendencia a episodios trombóticos, aterotrombóticos o hemorrágicos o un ensayo/procedimiento/sistema para identificar regímenes de tratamiento adecuados para individuos que lo necesitan como se reivindica. La variable de diagnóstico/pronóstico es una de un grupo de variantes de SNP identificadas en las reivindicaciones, ubicadas en el gen CNTN4. La identificación de tales individuos es útil ya que permite a un médico adaptar la intervención clínica en función del riesgo identificado por el ensayo. La invención también se refiere a un ensayo farmacogenómico para identificar individuos que son adecuados para la terapia antiplaquetaria, en el que el biomarcador es uno de un grupo de variables SNP identificadas en las reivindicaciones, ubicadas en el gen CNTN4. El ensayo es útil ya que ayuda a identificar individuos para los cuales los beneficios antitrombóticos del medicamento antiplaquetario superan los riesgos de hemorragia.

Los detalles de los SNP se proporcionan en las Tablas 1 y 2 a continuación, y la lista de las SECUENCIA adjunta, como sigue:

· SEQ ID NO: 1 (rs4235745) es un cambio C \rightarrow T ubicado en la posición 149171304 del gen PPARGC1 β , en el que T es el alelo menor.

ES 2 773 764 T3

- SEQ ID NO: 2 (rs32582) es un cambio C → A ubicado en la posición 149185610 del gen PPARGC1β, en el que A es el alelo menor.
- 5 · SEQ ID NO: 3 (rs28282) es un cambio C → G ubicado en la posición 149182399 del gen PPARGC1β, en el que G es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 4 (rs32581) es un cambio G → T ubicado en la posición 149185823 del gen PPARGC1β, en el que T es el alelo menor.
- 10 · SEQ ID NO: 5 (rs32574) es un cambio C → A ubicado en la posición 149199079 del gen PPARGC1β, en el que A es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 6 (rs17110447) es un cambio A → G ubicado en la posición 149173039 del gen PPARGC1β, en el que G es el alelo menor.
- 15 · SEQ ID NO: 7 (rs2161257) es un cambio A → G ubicado en la posición 149170190 del gen PPARGC1β, en el que G es el alelo menor.
- 20 · SEQ ID NO: 8 (rs32579) es un cambio C → T ubicado en la posición 149191041 del gen PPARGC1β, en el que T es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 9 (rs10515638) es un cambio G → T ubicado en la posición 149132724 del gen PPARGC1β, en el que T es el alelo menor.
- 25 · SEQ ID NO: 10 (rs32586) es un cambio A → G ubicado en la posición 149181113 del gen PPARGC1β, en el que G es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 11 (rs32588) es un cambio T → C ubicado en la posición 1491180236 del gen PPARGC1β, en el que C es el alelo menor.
- 30 · SEQ ID NO: 12 (rs32589) es un cambio G → A ubicado en la posición 149180082 del gen PPARGC1β, en el que A es el alelo menor.
- 35 · SEQ ID NO: 13 (rs251464) es un cambio G → C ubicado en la posición 149176427 del gen PPARGC1β, en el que C es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 14 (rs251468) es un cambio C → T ubicado en la posición 149174678 del gen PPARGC1β, en el que T es el alelo menor.
- 40 · SEQ ID NO: 15 (rs17110375) es un cambio A → G ubicado en la posición 149104421 del gen PPARGC1β, en el que G es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 16 (rs251460) es un cambio T → C ubicado en la posición 149177423 del gen PPARGC1β, en el que C es el alelo menor.
- 45 · SEQ ID NO: 17 (rs251463) es un cambio G → A ubicado en la posición 149176522 del gen PPARGC1β, en el que A es el alelo menor.
- 50 · SEQ ID NO: 18 (rs2052490) es un cambio C → A ubicado en la posición 149158366 del gen PPARGC1β, en el que A es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 19 (rs12189417) es un cambio de G → C ubicado en la posición 149168322 del gen PPARGC1β, en el que C es el alelo menor.
- 55 · SEQ ID NO: 20 (rs32577) es un cambio G → A ubicado en la posición 149192993 del gen PPARGC1β, en el que A es el alelo menor.
- SEQ ID NO: 21 (rs741580) es un cambio A → G ubicado en la posición 149181863 del gen PPARGC1β, en el que G es el alelo menor.
- 60 · SEQ ID NO: 22 (rs10510230) es un cambio A → C ubicado en la posición 2257130 del gen CNTN4, en el que C es

el alelo menor.

· SEQ ID NO: 23 (rs10503687) es un cambio A → G ubicado en la posición 20628221 del gen LZTS1, en el que G es el alelo menor.

5

· SEQ ID NO: 24 (rs10190010) es un cambio A → T ubicado en la posición 223714451 del gen KCNE4, en el que T es el alelo menor.

10

· SEQ ID NO: 25 (rs4684343) es un cambio G → A ubicado en la posición 2366098 del gen CNTN4, en el que A es el alelo menor.

En esta especificación, el término "trombosis" se refiere a la formación de un coágulo de sangre dentro de un vaso sanguíneo que obstruye el flujo sanguíneo dentro del vaso. El término "episodio aterotrombótico" se refiere a un episodio causado por el bloqueo de una arteria por un trombo, lo que resulta en una obstrucción local del flujo sanguíneo que conduce a condiciones hipóxicas o anóxicas. Los ejemplos de episodios aterotrombóticos incluyen accidente cerebrovascular y ataque cardíaco.

En esta especificación, los términos "episodio hemorrágico grave" y "complicación hemorrágica significativa" son términos reconocidos en la técnica que un cardiólogo preventivo entendería. Debe entenderse que los términos incluyen episodios hemorrágicos como hemorragia cerebral (como accidente cerebrovascular hemorrágico o hemorragia intracraneal) o hemorragia gastrointestinal.

En esta especificación, el término "terapia antiplaquetaria dual" debe entenderse como tratamiento con aspirina (o una variante/análogo de aspirina) y un segundo agente antiplaquetario como un antagonista del receptor de ADP (es decir, clopidogrel, ticlopidina o prasugrel), o dipiridamol.

El término "dosis alta", tal como se aplica a los agentes antiplaquetarios, debe entenderse que significa una dosis que es más alta que la prescrita convencionalmente para pacientes. Por lo tanto, para aspirina o clopidogrel, por ejemplo, una dosis alta significa una dosis superior a 100 mg al día, por ejemplo, una dosis de 150-300 mg o superior.

30

En esta especificación, el término "prevención primaria de episodios cardiovasculares" debe entenderse como el tratamiento de personas que solo tienen uno o varios factores de riesgo cardiovascular (presión arterial alta, tabaquismo, diabetes, colesterol alto u obesidad), y que no han sufrido un episodio mórbido todavía. En este grupo, si bien la aspirina reduce la cantidad de ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, la aspirina causa casi tantos episodios hemorrágicos significativos (accidentes cerebrovasculares hemorrágicos y hemorragias gastrointestinales graves que amenazan la vida) Lancet 2009; 373; 1849-60)

En esta especificación, el término "tratamiento secundario de episodios cardiovasculares" se refiere al tratamiento de individuos en los que el riesgo de un episodio aterotrombótico es grande (ataque cardíaco previo o accidente cerebrovascular isquémico) y los beneficios protectores de la terapia antiplaquetaria única (comúnmente aspirina) se ha demostrado claramente que superan los riesgos de hemorragia (BMJ 2002; 324; 71).

En esta especificación, el término "medicamentos que influyen en la hemostasia" debe entenderse como medicamentos antiplaquetarios, anticoagulantes, antiinflamatorios no esteroideos y fibrinolíticos/trombolíticos.

45

En esta especificación, el término "trastorno trombótico" debe entenderse que significa un mayor riesgo de formación de trombositis intravasculares patológicas

En esta especificación, el término "trastorno hemorrágico" debe entenderse como una mayor probabilidad de que ocurran episodios de hemorragia patológica.

La variable de diagnóstico de la invención es una variante alélica de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25. Por lo tanto, el transporte de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o una variante alélica mayor de la SECUENCIA ID NO 25 indica riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico. Del mismo modo, la ausencia de cualquiera de estas variantes indicaría un bajo riesgo de trombosis o aterotrombosis. Además, la ausencia de cualquiera de las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 o una variante alélica mayor de la SECUENCIA ID NO 25 indica el riesgo de un episodio hemorrágico mayor en un individuo, especialmente un individuo en terapia antiplaquetaria.

Los procedimientos de la invención son aplicables a individuos que están sanos, así como a individuos con enfermedad cardiovascular establecida o individuos que se consideran en riesgo de tener un episodio aterotrombótico tal como un ataque cardíaco o un derrame cerebral o un episodio hemorrágico grave. Adecuadamente, los procedimientos de la invención son para individuos que un clínico considera que están en riesgo de tener trombosis o un episodio

aterotrombótico.

El término "terapia antiplaquetaria" como se usa en esta invención se refiere al tratamiento de un individuo con un antagonista de plaquetas con el objetivo de atenuar la actividad plaquetaria. Los ejemplos de agentes antiplaquetarios incluyen inhibidores de COX-1 (es decir, aspirina y análogos de aspirina), inhibidores del receptor de ADP, inhibidores de la recaptación de adenosina y similares. El término "terapia antiplaquetaria única" significa el tratamiento con un único antagonista plaquetario.

El término "análogo de aspirina", como se usa en esta invención, se refiere a variantes de aspirina (acetilsalicilato) que retienen la actividad inhibidora de COX-1 de las plaquetas. Los ejemplos de análogos de aspirina en la bibliografía incluyen Alagha y col. (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 19, número 15, agosto de 2009), El término "terapia de aspirina" se refiere al tratamiento con aspirina o un análogo de aspirina.

Para un individuo positivo para las variantes alélicas menores de la SEQ ID NO 22, los términos "mayor riesgo de trombosis" o "mayor riesgo de un episodio aterotrombótico" deben entenderse como un aumento del riesgo de trombosis (típicamente trombosis arterial) o un episodio aterotrombótico en comparación con un individuo que no porta la variante alélica menor de SEQ ID NO 22. Para un individuo negativo para la variante alélica menor de la SEQ ID NO 25, el término "mayor riesgo de trombosis" o "mayor riesgo de un episodio aterotrombótico" debe entenderse que significa un mayor riesgo de trombosis (típicamente trombosis arterial) o un episodio aterotrombótico comparado con un individuo que es positivo para la variante alélica menor de SEQ ID NO 25.

Para un individuo negativo para la variante alélica menor de la SEQ ID NO 22, debe entenderse que el término "mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave" significa que es más probable que el individuo sufra un episodio hemorrágico grave en comparación con un individuo que llevó las variantes alélicas menores de la SEQ ID NO 22. Para un individuo positivo para la variante alélica menor de la SEQ ID NO 25, el término "mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave" debe entenderse que significa que el individuo tiene más probabilidades de sufrir un episodio hemorrágico grave, en comparación con un individuo que es negativo para la variante alélica menor de SEQ ID NO 25.

Debe entenderse que el término "trombosis arterial" significa trombosis que está mediada predominantemente por la adhesión y agregación plaquetaria, y que es la causa principal de la mayoría de los ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, y es distinta de la trombosis venosa, que es una forma de trombosis predominantemente mediada por la cascada de coagulación.

El término "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico del individuo, por ejemplo, sangre, suero, orina, saliva, tejido, líquido cefalorraquídeo y similares. Típicamente, la muestra biológica es, o se obtiene de, sangre, por ejemplo, como células sanguíneas, preparación o linfocitos, preparación obtenida de la sangre de los individuos.

En esta especificación, el término "tratamiento" se refiere a la administración de un medicamento, por ejemplo, uno o más agentes antiplaquetarios (o en ciertos casos un agonista o antagonista de PPARGC1 β) a un individuo que tiene, o es probable o está predispuesto a desarrollar, un trastorno trombotico, aterotrombótico o hemorrágico con el propósito de curar, sanar, prevenir, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperarse o mejorar el trastorno trombotico o hemorrágico. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del medicamento, por ejemplo, un agente antiplaquetario o, en algunos casos, un agonista o antagonista de PPARGC1 β que se requiere para conferir el efecto terapéutico deseado en el individuo, cuya cantidad variará dependiendo del tipo de medicamento, la vía de administración, el tipo y el estado del trastorno trombotico o hemorrágico, y la posible inclusión de otros agentes terapéuticos o excipientes.

Para practicar los procedimientos, la composición farmacéutica descrita anteriormente puede administrarse por vía oral, parenteral, por pulverización por inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral" como se usa en esta invención incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasnovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal. Una composición inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril, puede formularse según técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión o solución inyectable estéril en un solvente o diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los solventes y vehículos aceptables que pueden ser empleados se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites estériles fijos se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener diluyentes o dispersantes de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. También pueden usarse, a efectos de la formulación inyectable, otros tensioactivos que se usan comúnmente, como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de

la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, entre otras, cápsulas, tabletas, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores utilizados comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También suelen agregarse agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. En el caso de la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Se puede preparar una composición para inhalación o aerosol nasal según técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. Una composición que contiene compuesto multicíclico fusionado también se puede administrar en forma de supositorios para administración rectal.

El vehículo en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el ingrediente activo de la formulación (y preferible, capaz de estabilizarlo) y no perjudicial para el sujeto que se va a tratar. Por ejemplo, uno o más agentes solubilizantes, que forman complejos más solubles con los compuestos multicíclicos fusionados, o más agentes solubilizantes, pueden utilizarse como vehículos farmacéuticos para la administración de los compuestos activos. Los ejemplos de otros portadores incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y D&C Yellow #10.

El término "antagonista/agonista de PPARGC1 β " se refiere a un compuesto que es capaz de disminuir/aumentar la actividad de PPARGC1 β *en vivo*, respectivamente. La actividad se puede disminuir de varias maneras diferentes que serán evidentes para una persona experta en la técnica, incluida la reducción de la expresión de la proteína (por ejemplo, por medio de antagonistas/inhibidores de bajo peso molecular, como por ejemplo siRNA o shRNA), o inhibiendo directamente la actividad de la proteína administrando un inhibidor químico o un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica por PPARGC1 β o una subunidad PPARGC1 β . En una realización preferida de la invención, la invención se refiere a un antagonista/inhibidor de bajo peso molecular de la expresión de PPARGC1 β , cuyos detalles serán bien conocidos por la persona experta en el campo de la biología molecular, y que incluyen siRNA, shRNA, miRNA, oligonucleótidos antisentido y moléculas de ribozima. Los micro ARN (miRNA) son pequeños (~ 22nt) ARN no codificantes (ncRNA) que regulan la expresión génica a nivel de traducción. Alternativamente, las moléculas pequeñas de ARN en horquilla (shRNA) son moléculas cortas de ARN que tienen una pequeña asa en forma de horquilla en su estructura terciaria que puede emplearse para silenciar genes. El diseño de moléculas de miRNA o shRNA capaces de silenciar PPARGC1 β será evidente para los expertos en el campo del diseño de moléculas de miRNA o shRNA. Como alternativa, el nivel de expresión de PPARGC1 β puede modularse utilizando estrategias antisentido o ribozima para inhibir o prevenir la traducción de transcripciones de mRNA de PPARGC1 β o estrategias de triple hélice para inhibir la transcripción del gen PPARGC1 β . Las estrategias antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (ya sea ADN o ARN) que son complementarios al mRNA de PPARGC1 β . Los oligonucleótidos antisentido se unirán a las transcripciones de mRNA complementarias y evitarán la traducción. Las moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente los transcritos de mRNA de PPARGC1 β también se pueden usar para evitar la traducción y expresión de PPARGC1 β . (Véase, por ejemplo, Publicación internacional PCT WO90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver y col., 1990, Science 247: 1222-1225).

En una realización de la invención, el antagonista/inhibidor de PPARGC1 β es un antagonista de PPARGC1 β . Un ejemplo de un antagonista de PPARGC1 β es un anticuerpo anti-PPARGC1 β (es decir, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína PPARGC1 β humana). Un ejemplo de tal anticuerpo es un anticuerpo policlonal anti-PPARGC1 β vendido por Abnova con el número de catálogo H00133522-A01. En particular, PPARGC1 β purificado puede usarse para producir anticuerpos o para examinar bibliotecas de agentes farmacéuticos para identificar a aquellos que se unen específicamente a PPARGC1 β . Los anticuerpos contra PPARGC1 β también pueden generarse usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Tales anticuerpos pueden incluir, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Los anticuerpos neutralizantes (es decir, aquellos que inhiben la formación de dímeros) generalmente se prefieren para uso terapéutico. Los anticuerpos de cadena simple (por ejemplo, de camellos o llamas) pueden ser inhibidores enzimáticos potentes y pueden tener ventajas en el diseño de péptidos miméticos y en el desarrollo de inmunoabsorbentes y biosensores (Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302). Para la producción de anticuerpos, varios huéspedes, incluidos cabras, conejos, ratas, ratones, camellos, dromedarios, llamas, humanos y otros, pueden inmunizarse mediante inyección con PPARGC1 β o con cualquier fragmento u oligopéptido del mismo que tenga propiedades inmunogénicas (especialmente el fragmento especificado más arriba). Dependiendo de la especie huésped, se pueden usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen de modo no taxativo, Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias activas en la superficie tal como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol.

Se prefiere que los oligopéptidos, péptidos o fragmentos utilizados para inducir anticuerpos contra PPARGC1 β tengan una secuencia de aminoácidos que consista en al menos aproximadamente 5 aminoácidos, y generalmente que consista en al menos aproximadamente 10 aminoácidos. También es preferible que estos oligopéptidos, péptidos o fragmentos sean idénticos a una porción de la secuencia de aminoácidos de la proteína natural. Los anticuerpos monoclonales contra

5 PPARGC1 β pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estos incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma EBV. (Véase, por ejemplo, Kohler, G. y col. (1975) *Nature* 256: 495-497; Kozbor, D. y col. (1985) *J. Immunol. Procedimientos* 81: 31-42; Cote, R. J. y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 80: 2026-2030; y Cole, SPetal. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 62: 109-120.)

10 Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", tales como la unión de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (véase, por ejemplo, Morrison, S. L. y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 81: 6851-6855; Neuberger, M. S. y col. (1984) *Nature* 312: 604-608; y Takeda, S. y col. (1985) *Nature* 314: 452-454.).

15 Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse, utilizando procedimientos conocidos en la técnica, para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos de PPARGC1 β . Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de composición idiotípica distinta, pueden generarse mediante la combinación aleatoria de cadenas de bibliotecas de inmunoglobulina combinatorias aleatorias (véase, por ejemplo, Burton, D. R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 88: 10134-10137.). Los anticuerpos también pueden

20 producirse induciendo la producción in vivo en la población de linfocitos o seleccionando bibliotecas de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Orlandi, R. y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 86: 3833-3837).

También se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específicos para PPARGC1 β . Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, entre otros, fragmentos F(ab')₂ producidos por la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos Fab generados al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, las bibliotecas de expresión de Fab pueden construirse para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (véase, por ejemplo, Huse, W. D. y col. (1989) *Science* 246: 1275-1281)

30 Se pueden usar varios inmunoensayos para la detección para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para la unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas son bien conocidos en la técnica. Tales inmunoensayos típicamente implican la medición de la formación de complejos entre PPARGC1 β y su anticuerpo específico. Generalmente se usa un

35 inmunoensayo monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos PPARGC1 β no interferentes, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitiva (Pound, supra). Se pueden usar varios procedimientos, tales como el análisis de Scatchard junto con técnicas de radioinmunoensayo para evaluar la afinidad de los anticuerpos por PPARGC1 β . La afinidad se expresa como una constante de asociación, K_a, que se define como la concentración molar del complejo PPARGC1 β -anticuerpo dividido por las concentraciones molares de antígeno libre y

40 anticuerpo libre en condiciones de equilibrio. La K_a determinada para una preparación de anticuerpos policlonales, que son heterogéneos en sus afinidades por múltiples epítomos PPARGC1 β , representa la afinidad o avidez promedio de los anticuerpos para PPARGC1 β . La K_a determinada para una preparación de anticuerpos monoclonales, que son monoespecíficos para un epítomo particular de PPARGC1 β , representa una verdadera medida de afinidad. Preparaciones de anticuerpos de alta afinidad con K_a que van desde aproximadamente 10⁹ a 10¹² L/mol se prefieren para su uso en

45 inmunoensayos.

El título y la avidez de las preparaciones de anticuerpos policlonales pueden evaluarse adicionalmente para determinar la calidad y la idoneidad de tales preparaciones para ciertas aplicaciones posteriores. Por ejemplo, una preparación de anticuerpo policlonal que contiene al menos 1-2 mg de anticuerpo específico/ml, preferentemente 5-10 mg de anticuerpo

50 específico/ml, generalmente se emplea en procedimientos que requieren la precipitación de complejos PPARGC1 β -anticuerpo. Los procedimientos para evaluar la especificidad, el título y la avidez de los anticuerpos, y las pautas para la calidad y el uso de anticuerpos en diversas aplicaciones, generalmente están disponibles.

También se describen sistemas (y medios legibles por ordenador para causar sistemas informáticos) para realizar un

55 procedimiento para detectar y/o identificar que un paciente está en riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico o un episodio hemorrágico grave.

También se describen módulos funcionales, que se definen mediante instrucciones ejecutables por ordenador grabadas en medios legibles por ordenador y que hacen que un ordenador realice las etapas del procedimiento cuando se ejecuta.

60 Los módulos se segregan por función, en virtud de la claridad. Sin embargo, debería entenderse que no es necesario que los módulos/sistemas correspondan a bloques discretos de código y las funciones descritas se pueden llevar a cabo mediante la ejecución de varias partes del código almacenadas en varios medios y que se ejecutan en varios momentos.

Además, debería apreciarse que los módulos pueden realizar otras funciones, por lo tanto, los módulos no se limitan a tener funciones o conjuntos de funciones particulares.

El medio de almacenamiento legible por ordenador # 30 puede ser cualquier medio tangible disponible al que pueda acceder un ordenador. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen medios tangibles volátiles y no volátiles, extraíbles y no extraíbles implementados en cualquier procedimiento o tecnología para el almacenamiento de información tales como instrucciones legibles por ordenador, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen, de modo no taxativo, RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria de solo lectura), EPROM (memoria de solo lectura programable borrable), EEPROM (memoria de solo lectura programable borrable eléctricamente), memoria flash u otra tecnología de memorias, CD-ROM (memoria de solo lectura en disco compacto), DVDs (discos versátiles digitales) u otros medios de almacenamiento óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, disco magnético de almacenamiento u otros medios de almacenamiento, otros tipos de memoria volátil y no volátil, y otro tipo de medio tangible que puede utilizarse para almacenar la información deseada y al que se puede acceder mediante un ordenador que incluye cualquier combinación adecuada de los anteriores.

Los datos legibles por ordenador incorporados en uno o más medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden definir instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas, que, como resultado de ser ejecutados por un ordenador, indican al ordenador que realice una o más de las funciones descritas en esta invención, y/o diversas realizaciones, variaciones y combinaciones de las mismas. Estas instrucciones se pueden escribir en cualquiera de los múltiples lenguajes de programación, por ejemplo, Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje ensamblador COBOL, y similares, o cualquiera de las diversas combinaciones de estos. El medio legible por ordenador en el cual se comprenden dichas instrucciones puede residir en uno o más de cada uno de los componentes de un sistema, o un medio de almacenamiento legible por ordenador descrito en esta invención se puede distribuir a través de uno o más de tales componentes.

Los medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden ser transportables de tal manera que las instrucciones almacenadas en los mismos pueden cargarse en cualquier recurso informático para implementar los aspectos de la presente invención discutidos en esta invención. Además, debería apreciarse que las instrucciones almacenadas en el medio legible por ordenador, que se describieron anteriormente, no se limitan a las instrucciones comprendidas como parte de un programa de aplicaciones que se ejecuta en un ordenador central. En su lugar, las instrucciones pueden estar representadas como cualquier tipo de código informático (por ejemplo, software o microcódigo) que se puede emplear para programar un ordenador para implementar aspectos de la presente invención. Las instrucciones ejecutables por ordenador pueden estar escritas en cualquier idioma informático adecuado o en una combinación de varios lenguajes. Los expertos en la técnica conocen procedimientos básicos de biología computacional y se describen, por ejemplo, en Setubal y Meidanis y col., *Introducción a los procedimientos de biología computacional* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Procedimientos computacionales en biología molecular*, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi y Buehler, *Conceptos básicos de bioinformática: Aplicación en Ciencias Biológicas y Medicina*. (CRC Press, Londres, 2000) y Ouelette y Bzevanis *Bioinformatics: Una guía práctica para el análisis de genes y proteínas* (Wiley & Sons, Inc., 2nd ed., 2001).

Los módulos funcionales incluyen como mínimo un sistema de determinación # 40, un dispositivo de almacenamiento # 30, un módulo de comparación # 80 y un módulo de visualización # 110. Los módulos funcionales se pueden ejecutar en uno o múltiples ordenadores, o mediante el uso de una o múltiples redes informáticas. El sistema de determinación tiene instrucciones ejecutables por ordenador para proporcionar, por ejemplo, información de la SECUENCIA en forma legible por ordenador.

El sistema de determinación #40, puede comprender cualquier sistema para detectar al menos una de las variantes alélicas asociadas con el riesgo de trombosis/episodio aterotrombótico/episodio hemorrágico grave. Se pueden utilizar procedimientos estándar tales como RT-PCR.

Además, se pueden determinar otros factores como la presión arterial, la altura, el peso, la circunferencia de la cintura, los brazos, las piernas, el hábito de fumar, el perfil lipídico, la presencia de diabetes, la glucosa en ayunas, la hemoglobina glicosilada y otros biomarcadores más nuevos, incluidos, entre otros, la proteína C-reactiva en plasma, actividad enzimática de la fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas, grosor de la íntima media carótida común y calcio en la arteria coronaria. Estos factores pueden usarse junto con los biomarcadores de la variante genética.

El dispositivo de almacenamiento #30 puede leer la información determinada en el sistema de determinación. Tal como se usa en esta invención se pretende que el "módulo de almacenamiento" incluya cualquier aparato de computación o procesamiento u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Los ejemplos de un aparato electrónico adecuado para usar con la presente invención incluyen un aparato informático independiente, redes de telecomunicaciones de datos, que incluyen redes de área local (LAN), redes de área amplia (WAN), Internet, Intranet y Extranet, y sistemas de procesamiento informático locales y distribuidos. Los módulos de almacenamiento también

incluyen, de modo no taxativo: medios de almacenamiento magnéticos, tales como disquete, medios de almacenamiento en disco duro, unidades flash, cinta magnética, medios de almacenamiento ópticos tales como CD-ROM, DVD, medios de almacenamiento electrónicos tales como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, discos duros en general e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos. El dispositivo de almacenamiento

5 está adaptado o configurado para haber registrado en él información de la SECUENCIA de ácido nucleico. Tal información se puede proporcionar en formato digital que se pueda transmitir y leer de manera electrónica, por ejemplo, mediante Internet, en una unidad flash, mediante USB (bus universal en serie) o mediante cualquier otro modo de comunicación adecuado.

10 Como se usa en esta invención, "almacenado" se refiere a un proceso para codificar información en el dispositivo de almacenamiento. Los expertos en la materia pueden adoptar fácilmente cualquiera de los procedimientos actualmente conocidos para registrar información en medios conocidos para generar productos que comprenden información relacionada con estas variantes alélicas.

15 Los datos de referencia almacenados en el dispositivo de almacenamiento que van a ser leídos por el módulo de comparación se comparan, por ejemplo, la identidad de una variante alélica menor para cada SNP que se va a detectar y se correlaciona con el riesgo.

El "módulo de comparación" # 80 puede usar una variedad de programas y formatos de software disponibles para el operativo de comparación para comparar datos de información de la SECUENCIA determinados en el sistema de determinación para hacer referencia a muestras y/o datos de referencia almacenados. El módulo de comparación está configurado para usar técnicas de reconocimiento de patrones para comparar información de una o más entradas con uno o más patrones de datos de referencia. El módulo de comparación puede configurarse utilizando software existente disponible comercialmente o libremente para comparar patrones, y puede optimizarse para comparaciones de datos

25 particulares que se llevan a cabo. El módulo de comparación proporciona información legible por ordenador relacionada con el genotipo de la muestra.

El módulo de comparación, o cualquier otro módulo de la invención, puede incluir un sistema operativo (por ejemplo, UNIX) en el que se ejecuta un sistema de gestión de bases de datos relacionales, una aplicación de Internet y un servidor de Internet. La aplicación de Internet incluye el código ejecutable necesario para generar declaraciones de lenguaje de bases de datos (por ejemplo, declaraciones del lenguaje de consulta estructurado (SQL)). Generalmente, los ejecutables incluirán las declaraciones de SQL. Además, la aplicación de Internet incluye un archivo de configuración que contiene indicaciones y direcciones sobre las diversas entidades de software que comprenden el servidor, así como las diversas bases de datos internas y externas a las que se debe acceder para atender las solicitudes de los usuarios. El archivo de

30 Configuración dirige las solicitudes de recursos del servidor al hardware adecuado, de ser necesario si el servidor se distribuye entre dos o más ordenadores independientes. En una modalidad, el servidor de Internet respalda un protocolo TCP/IP. A veces se hace referencia a las redes locales como esta como "Intranets". Una ventaja de dichas Intranets es que estas permiten la comunicación fácil con las bases de datos de dominio público que residen en Internet (por ejemplo, los sitios web de GenBank o Swiss Pro). Por lo tanto, en una realización particular de la presente invención, los usuarios

40 pueden acceder directamente a los datos (mediante hipervínculos, por ejemplo) que residen en bases de datos en Internet utilizando una interfaz HTML proporcionada por los buscadores web y los servidores web.

El módulo de comparación proporciona un resultado de comparación legible por ordenador que puede procesarse en forma legible por ordenador mediante criterios predefinidos, o criterios definidos por un usuario, para proporcionar un

45 contenido basado en parte en el resultado de comparación que puede almacenarse y enviarse según lo solicite un usuario utilizando un módulo de visualización # 110.

El contenido basado en el resultado de la comparación se muestra en un monitor de ordenador # 120. El contenido basado en el resultado de la comparación se muestra a través de medios imprimibles #130, #140. El módulo de visualización puede ser cualquier dispositivo adecuado configurado para recibir desde un ordenador la información legible por ordenador y presentársela a un usuario. Los ejemplos no taxativos incluyen, por ejemplo, ordenadores de uso general tales como los que se basan en procesadores de tipo Intel PENTIUM, procesadores Motorola PowerPC, Sun UltraSPARC, Hewlett-Packard PA-RISC, cualquiera de los diversos procesadores comercializados por Advanced Micro Devices (AMD) de Sunnyvale, California, o cualquier otro tipo de procesador, dispositivos de pantalla visual tales como pantallas planas,

55 tubos de rayos catódicos y similares, así como impresoras para ordenadores de varios tipos.

Se utiliza un navegador de Internet para proporcionar una interfaz de usuario para mostrar el contenido en función del resultado de la comparación. Debería entenderse que se pueden adaptar otros módulos de la invención para tener una interfaz de buscador web. A través del buscador web, un usuario puede construir solicitudes para recuperar datos a partir del módulo de comparación. Por lo tanto, el usuario comúnmente señalará y hará clic en elementos de la interfaz de usuario tales como botones, menús desplegables, barras de desplazamiento y similares empleados convencionalmente en interfaces gráficas de usuario.

60

Por lo tanto, los procedimientos descritos en esta invención proporcionan sistemas (y medios legibles por ordenador para causar sistemas informáticos) para realizar procedimientos como se describe en las Declaraciones de invención anteriores, por ejemplo (a) procedimientos de identificación de un individuo en riesgo de trombosis, un episodio
 5 aterotrombótico o un episodio hemorrágico grave, (b) procedimientos de identificación de un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria única en la prevención primaria de episodios cardiovasculares, (c) procedimientos de identificación de un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios con
 10 terapia antiplaquetaria dual en la prevención secundaria de episodios cardiovasculares, (d) procedimientos de identificación de un individuo que pueda sufrir una complicación hemorrágica significativa cuando se somete a un tratamiento con medicamentos que influyen en la hemostasia, (e) procedimientos de identificación de un individuo que pueda sufrir complicaciones tromboticas cuando se le recetan antagonistas de COX2 o agonistas de PPARy, y (f) procedimientos de identificación de un individuo adecuado para el tratamiento con una dosis más alta de terapia antiplaquetaria.

15 Los sistemas y los medios legibles por ordenador descritos en esta invención son meramente ilustrativos para realizar procedimientos de diagnóstico en un individuo, y no pretenden limitar el alcance de la invención. Son posibles variaciones de los sistemas y los medios legibles por ordenador descritos en esta invención.

Los módulos de la máquina, o los que se utilizan en el medio legible por ordenador, pueden asumir numerosas
 20 configuraciones. Por ejemplo, la función puede proporcionarse en una sola máquina o distribuirse en múltiples máquinas.

Experimento

Se investigaron los determinantes genéticos de la TxM urinaria. 540 participantes en el subestudio de ASCOT de la
 25 Enfermedad Cardiovascular Asociada a la Hipertensión (HACVD) dieron muestras de orina en dos puntos de tiempo separados. La TxM se midió usando cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem, expresada como pg/mg de creatinina para corregir la concentración de orina. Todos los sujetos fueron genotipados en el chip CVD50K, un chip cardiovascular específico con > 50.000 SNP. Se aplicaron medidas habituales de control de calidad. Se realizó un análisis de regresión lineal, asumiendo un modelo genético aditivo, ajustando las covariables; edad, sexo, hábito de fumar,
 30 diabetes, presión arterial sistólica, IMC, HDL, LDL, aspirina y régimen antihipertensivo.

Como se esperaba, se encontró que los niveles de TxM eran significativamente más bajos en pacientes que tomaban aspirina (n = 268) *frente a* aquellos que no toman aspirina (n = 272) (mediana [intervalo intercuartil]; 324 [211,404] *frente a* 716 [460,913] pg/mg, p <0,0001). 21 SNPs en el gen PPARGC1β (véase la Tabla 1 a continuación) se asociaron
 35 significativamente con una TxM más alta (intervalo de valores beta; +123- +223 pg/mg, intervalo de valores p; 0,000004-0,008). Otros análisis condicionales y de haplotipos demostraron que 3 de las 21 variantes se asociaron independientemente con TxM (rs4235745, rs32582, rs10515638). Lo más interesante de todo fue la observación de que la asociación de TxM con los 21 SNP del gen PPARGC1β fue impulsada casi totalmente por los pacientes que no tomaron aspirina (intervalo de valores beta; +184- +392 pg/mg intervalo de valores p; 0,00002-0,06), mientras que las asociaciones
 40 entre estos mismos 21 SNP y TxM entre sujetos aspirinados no fueron en gran medida estadísticamente significativas (intervalo de valores beta; -10- +134 pg/mg intervalo de valores p; 0,02-0,97).

Los hallazgos anteriores ilustran claramente que las variantes genéticas en PPARGC1β influyen fuertemente en la formación de tromboxano: el transporte de uno de estos SNP se asoció con un incremento en TxM de magnitud similar al
 45 decremento en TxM asociado con la toma de aspirina. Además, dado que la asociación solo se observó en pacientes que no tomaron aspirina, parece que la aspirina completa, o en gran parte, bloquea el exceso de producción de tromboxano en los portadores de variantes genéticas PPARGC1β.

Como se ha demostrado previamente que TxM predice futuros episodios cardiovasculares como accidente cerebrovascular e infarto de miocardio, las mismas variantes genéticas en PPARGC1β servirán como un nuevo biomarcador genético para la identificación de individuos con mayor riesgo de trombosis y episodios aterotrombóticos. El solicitante también ha demostrado una asociación entre las variantes genéticas y la trombosis y los episodios aterotrombóticos, que es independiente de los factores de riesgo cardiovascular establecidos: edad, sexo, régimen de tratamiento para bajar la presión arterial, régimen de tratamiento para bajar los lípidos, tabaquismo, índice de masa
 55 corporal, presión arterial sistólica, presencia de diabetes y niveles de glucosa, triglicéridos, HDL y colesterol total.

Además, dado que los portadores de variantes genéticas PPARGC1β tienen un mayor riesgo de trombosis y episodios aterotrombóticos, y la aspirina revierte este exceso de riesgo de trombosis, es probable que estos sujetos tengan una mayor relación riesgo/beneficio mientras toman aspirina y/u otros medicamentos antiplaquetarios.

60 Se realizó un estudio adicional de asociación de genoma adicional, utilizando el chip CNV370 para buscar determinantes genéticos adicionales de TxM urinario. El chip CNV370 (Illumina Inc, San Diego, CA, EE. UU.) contiene 318.000

polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) espaciados uniformemente e informativos y 52.167 marcadores CNV. Los SNP genotipados en el chip CNV370-Duo se usaron para imputar los genotipos de otros 1.884.210 SNP no genotipados utilizando datos de haplotipos en fase de individuos densamente genotipados (de ascendencia europea) de la colección del panel de referencia CEU HapMap II versión 22, utilizando el programa MACH. Se aplicaron medidas de control de calidad similares y se realizaron análisis de regresión lineal similares en los datos CNV370 como en los datos CVD50K.

Cuatro SNP adicionales de 3 regiones genie (CNTN4: rs10510230, rs4684343; LZTS1: rs10503687; KCNE4: rs10190010), se asociaron significativamente con los niveles de TxM. Véase la Tabla 2 para más detalles.

10 Juntos, los SNP de las cuatro regiones genie (PPARGC1 β , CNTN4, LZTS1 y KCNE4 explican una proporción considerable de la variabilidad en TxM en sujetos que no toman aspirina - en un análisis multivariante se descubrió que el genotipo PPARGC1 β explica el 9% de la variabilidad, y CNTN4, LZTS1 y los genotipos KCNE4 explicaron un 3%, 8% y 5% adicionales, respectivamente.

15 **Tabla 1**

SNP	CHR	BP	A1	A2	TODOS LOS SUJETOS (N = 540)					TOMANDO ASPIRINA (N = 268)					NO TOMANDO ASPIRINA (N = 272)				
					A1	NMISS	BETA	P	MAF	A1	NMISS	BETA	P	MAF	A1	NMISS	BETA	P	MAF
rs4235745	5	149171304	T	C	T	540	167	4,3E-06	0,30	T	268	50	0,06	0,31	T	272	285	2,2E-05	0,29
rs32582	5	149185610	A	C	A	540	201	9,1E-06	0,171	A	268	45	0,18	0,17	A	272	353	2,1E-05	0,17
rs28282	5	149182399	G	C	G	540	157	1,1E-05	0,31	G	268	49	0,07	0,31	G	272	262	6,2E-05	0,31
rs32581	5	149185823	T	G	T	540	159	2,1E-05	0,28	T	268	53	0,06	0,29	T	272	260	1,4E-04	0,28
rs32574	5	149199079	A	C	A	539	165	5,1E-05	0,23	A	267	60	0,05	0,25	A	272	273	3,1E-04	0,21
rs17110447	5	149173039	G	A	G	540	149	6,0E-05	0,28	G	268	47	0,09	0,29	G	272	253	2,4E-04	0,27
rs2161257	5	149170190	G	A	G	540	123	2,7E-04	0,44	G	268	52	0,05	0,45	G	272	184	2,3E-03	0,43
rs32579	5	149191041	T	C	T	540	130	3,7E-04	0,30	T	268	34	0,21	0,30	T	272	221	9,2E-04	0,30
rs10515638	5	149132724	T	G	T	540	223	7,3E-04	0,07	T	268	75	0,12	0,07	T	272	392	1,9E-03	0,07
rs32586	5	149181113	G	A	G	540	173	7,6E-04	0,121	G	268	9	0,81	0,12	G	272	365	2,1E-04	0,11
rs32588	5	149180236	C	T	C	540	173	7,6E-04	0,12	C	268	9	0,81	0,12	C	272	365	2,1E-04	0,11
rs32589	5	149180082	A	G	A	540	173	7,6E-04	0,12	A	268	9	0,81	0,12	A	272	365	2,1E-04	0,11
rs251464	5	149176427	C	G	C	540	125	9,4E-04	0,26	C	268	23	0,41	0,26	C	272	237	9,3E-04	0,26
rs251468	5	149174678	T	C	T	540	125	9,4E-04	0,26	T	268	23	0,41	0,26	T	272	237	9,3E-04	0,26
rs17110375	5	149104421	G	A	G	540	208	1,3E-03	0,07	G	268	66	0,17	0,07	G	272	351	3,5E-03	0,08
rs251460	5	149177423	C	T	C	540	129	1,4E-03	0,21	C	268	-1	0,97	0,19	C	272	257	5,2E-04	0,22
rs251463	5	149176522	A	G	A	540	129	1,4E-03	0,21	A	268	-1	0,97	0,19	A	272	257	5,2E-04	0,22
rs2052490	5	149158366	A	C	A	540	154	1,7E-03	0,14	A	268	-7	0,84	0,13	A	272	327	3,7E-04	0,14
rs12189417	5	149168322	C	G	C	540	152	1,8E-03	0,14	C	268	-7	0,84	0,13	C	272	322	4,3E-04	0,15
rs32577	5	149192993	A	G	A	540	149	2,9E-03	0,13	A	268	-10	0,79	0,13	A	272	313	7,8E-04	0,13
rs741580	5	149181863	G	A	G	538	203	8,0E-03	0,05	G	267	134	0,02	0,05	G	271	262	5,6E-02	0,05

La Tabla 1 enumera los SNP en PPARGC1B que se asociaron significativamente con TxM en todos los sujetos (N = 540, P < 0,01). También se muestran los valores para los sujetos desglosados por aquellos que toman aspirina y aquellos que no toman aspirina, en el momento de la medición de TxM. A1 denota el alelo menor o menos frecuente, A2 el alelo mayor o más frecuente. MAF denota menor frecuencia de alelos. Los valores BETA son el aumento de TxM (pg/mg de creatinina) asociada con el transporte de 1 alelo menor (A1).

25 **Tabla 2**

SNP	CHR	BP	A1	A2	TODOS LOS SUJETOS (N = 772)					SIN ASPIRINA (N = 396)					CON ASPIRINA (N = 376)				
					A1	NMISS	BETA	P	MAF	A1	NMISS	BETA	P	MAF	A1	NMISS	BETA	P	MAF
rs10510230	3	2257130	C	A	C	772	191,3	6,0E-07	0,16	C	396	328,9	1,9E-07	0,16	C	376	37,6	0,34	0,16
rs4684343	3	2366098	A	G	A	772	-133,4	8,9E-07	0,45	A	396	-194,6	2,5E-05	0,47	A	376	-65,2	0,02	0,43
rs10503687	8	20628221	G	A	G	772	263,7	5,4E-06	0,06	G	396	446,9	2,7E-06	0,06	G	376	50,1	0,41	0,06
Rs10190010	2	223714451	T	A	T	772	218,1	5,7E-06	0,09	T	396	365,7	1,4E-05	0,09	T	376	72,9	0,11	0,09

Tabla 2: SNPS en CNTN4, LZTS1 y KCNE4 que se asociaron significativamente con TxM (P < 10⁻⁵). Se muestran los valores para todos los sujetos y también para aquellos que toman aspirina y aquellos que no toman aspirina, en el momento de la medición de TxM. A1 denota el alelo menor o menos frecuente, A2 el alelo mayor o más frecuente. MAF denota menor frecuencia de alelos. Los valores BETA son el cambio de TxM (pg/mg de creatinina) asociada con el

transporte de 1 alelo menor (A1).

LISTADO de la SECUENCIAS

- 5 <110> Royal College of Surgeons en Irlanda
- <120> Identificación de trombosis o riesgo de hemorragia en un individuo con y sin terapia antiplaquetaria
- <130> P10685PC00
- 10 <150> EP11166142.7
- <151> 14-05-2011
- <160> 25
- 15 <170> Patente en versión 3.3
- <210> 1
- <211> 61
- 20 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> variación
- 25 <222> (31) .. (31)
- <300>
- <308> rs4235745
- <309> 17-01-2009
- 30 <313> (1) .. (61)
- <300>
- <308> dbSNP/rs4235745
- <309> 17-01-2009
- 35 <313> (1) .. (61)
- <400> 1
- agctgaatct tagtaaataa acaactaagt yggtagggagc agaccagctg aggctctcag 60
- g 61
- 40 <210> 2
- <211> 61
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 45 <220>
- <221> variación
- <222> (31) .. (31)
- <300>
- 50 <308> dbSNP/rs32582
- <309> 17-01-2009
- <313> (1) .. (61)
- <400> 2
- ccaccactgt catcatcatic atcgatcatgg magaaatcgt gtaacagtag cagcactagc 60
- 55 a 61
- <210> 3
- <211> 61

ES 2 773 764 T3

<400> 9
 gttgtactgt gaacatacct ggtgottaag ktaaaggcgc tggctgtggt ggcggtgcag 60
 g 61

<210> 10
 5 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <221> variación
 <222> (31) .. (31)

<300>
 <308> dbSNP/rs32586
 15 <309> 17-01-2009
 <313> (1) .. (61)

<400> 10
 gggcatgtaa tggctagcat ttccctgaag raggcctctt acggaataat atgatgtctg 60
 g 61

20
 <210> 11
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25
 <220>
 <221> variación
 <222> (31) .. (31)

30 <300>
 <308> dbSNP/rs32588
 <309> 17-01-2009
 <313> (1) .. (61)

35 <400> 11
 ggagcaactc tatgctgact ttccagaact ygacctctcc cagctggatg ccagcgactt 60
 t 61

<210> 12
 <211> 61
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> variación
 45 <222> (31) .. (31)

<300>
 <308> dbSNP/rs32589
 <309> 17-01-2009
 50 <313> (1) .. (61)

<400> 12
 ctttccattt cttggtcatt tggcaaaatc rggccttggc cacgggtcca gattagctgc 60
 a 61

55 <210> 13

ES 2 773 764 T3

<211> 61
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> variación
 <222> (31) .. (31)

<300>

10 <308> dbSNP/rs251464
 <309> 17-01-2009
 <313> (1) .. (61)

<400> 13
 ctggttctaa agctgtttct aagaagcaag scctacaaag gtggctgctc tgagttactg 60

15 g 61

<210> 14
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> variación
 <222> (31) .. (31)

25 <300>
 <308> dbSNP/rs251468
 <309> 17-01-2009
 <313> (1) .. (61)

30 <400> 14
 cacgttgagg ggccagagag gccctacaca ygggccgtac aaacagtgtg tttggtccca 60

g 61

<210> 15
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <221> variación
 <222> (31) .. (31)

40 <300>
 <308> dbSNP/rs17110375
 <309> 17-01-2009
 <313> (1) .. (61)

45 <400> 15
 atttataaag tttgcatatt gttagcatac rtaattcctt gatgaagcca gatgaatgag 60

t 61

50 <210> 16
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <220>

ES 2 773 764 T3

<313> (1) .. (61)

<400> 19
 gttagaggggc ctggaaccag gaaagaaact saactctcag cgtttttgcc cccacagac 60
 t 61

5
 <210> 20
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10
 <220>
 <221> variación
 <222> (31) .. (31)

15 <300>
 <308> dbSNP/rs32577
 <309> 17-01-2009
 <313> (1) .. (61)

20 <400> 20
 caagacagt caggcctccc ctggtcgccc rctctcgtg gaggaggtaa ggatcgcagc 60
 t 61

<210> 21
 <211> 61

25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> variación

30 <222> (31) .. (31)

<300>
 <308> dbSNP/rs741580
 <309> 17-01-2009

35 <313> (1) .. (61)

<400> 21
 cctccatttt cttgcttgaa caatggggac rattcctttg ctatattggt cctttcctct 60
 t 61

40 <210> 22
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <221> variación
 <222> (27) .. (27)

<300>

50 <308> dbSNP/rs10510230
 <309> 13-11-2003
 <313> (1) .. (49)

<400> 22

55 ttccaaatat accaacagca gatatomaat gaccattact tcatactaga ag 52

<210> 23

<211> 52
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <221> variación
 <222> (27) .. (27)
 <300>
 10 <308> dbSNP/rs10503687
 <309> 20-04-2007
 <313> (1) .. (49)
 <400> 23
 15 acctatgcat cattctaact ggtcacrcc cactgtagcc aacctcagaa gt 52
 <210> 24
 <211> 52
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> variación
 <222> (27) .. (27)
 25 <300>
 <308> dbSNP/10190010
 <309> 05-11-2003
 <313> (1) .. (49)
 30 <400> 24
 caaacacat gcctagtgcc tcagacwgta cctggaactt ggtaggaact ta 52
 <210> 25
 35 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 40 <221> variación
 <222> (27) .. (27)
 <300>
 <308> dbSNP/4684343
 45 <309> 12-02-2003
 <313> (1) .. (49)
 <400> 25
 50 gtacacaata acccttctaa ttgcacrta aatgaaggac tgtaaacttc at 52

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la identificación de un individuo con mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, que comprende una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para detectar la presencia de una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 se correlaciona con el individuo que tiene un mayor riesgo de una trombosis o un episodio aterotrombótico, y donde la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo tenga un mayor riesgo de una trombosis o un episodio aterotrombótico.
2. Un procedimiento para la identificación de un individuo con mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave seleccionado de entre hemorragia cerebral y hemorragia gastrointestinal, que comprende una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para detectar la presencia de una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la ausencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 se correlaciona con el individuo que tiene un mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave, y donde la presencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo tenga un mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave seleccionado de entre hemorragia cerebral y hemorragia gastrointestinal.
3. Un procedimiento para identificar a un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria única en la prevención primaria de episodios cardiovasculares, comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para detectar la presencia de una variante alélica menor seleccionada de la SECUENCIA ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo sea adecuado para la terapia antiplaquetaria única.
4. Un procedimiento para identificar a un individuo adecuado para el tratamiento con una dosis alta de terapia antiplaquetaria, comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para detectar la presencia de una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo sea adecuado para una dosis alta de terapia antiplaquetaria.
5. Un procedimiento para identificar a un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la terapia antiplaquetaria dual en la prevención secundaria de episodios cardiovasculares, comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para detectar la presencia de una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con que el individuo sea adecuado para la terapia antiplaquetaria dual.
6. Un procedimiento para identificar a un individuo con probabilidad de sufrir una complicación hemorrágica significativa cuando se somete a un tratamiento con medicamentos que influyen en la hemostasia, comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para detectar la ausencia de una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la ausencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la presencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con la probabilidad de que el individuo sufra una complicación hemorrágica significativa cuando se somete a un tratamiento con un medicamento que influye en la hemostasia.
7. Un procedimiento para identificar a un individuo con probabilidad de sufrir una complicación trombótica cuando se le receta un antagonista de COX2 o un agonista de PPAR γ , comprendiendo el procedimiento una etapa de analizar una muestra biológica del individuo para detectar la presencia de una variante alélica menor seleccionada de las SECUENCIAS ID NO 22 y 25, donde la presencia de una variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 22 o la ausencia de la variante alélica menor de la SECUENCIA ID NO 25 se correlaciona con la probabilidad de que el individuo sufra una complicación trombótica cuando se le receta un antagonista de COX2 o un agonista de PPAR γ .
8. Un ensayo para identificar a un sujeto que tiene una mayor probabilidad de sufrir un episodio trombótico o aterotrombótico, que comprende: (a) identificar al menos un alelo de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SECUENCIA ID NO 22 y 25 en una muestra biológica obtenida de un sujeto; y (b) comparar al menos un alelo identificado con una lista de alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 y las variantes alélicas principales de la SECUENCIA ID NO 25, y, si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo, identificar entonces al sujeto como que tiene una mayor probabilidad de sufrir un episodio trombótico o aterotrombótico.
9. Un ensayo para identificar a un sujeto que tiene una mayor probabilidad de sufrir un episodio hemorrágico grave, que comprende: (a) identificar al menos un alelo de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo

que consiste en las SECUENCIAS ID NO 22 y 25 en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene un mayor riesgo de un episodio hemorrágico grave; y (b) comparar al menos un alelo identificado con una lista de alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas principales de la SECUENCIA ID NO 22 y las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 25, y, si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo, 5 identificar entonces al sujeto como que tiene una mayor probabilidad de sufrir un episodio hemorrágico grave.

10. Un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento primario o secundario para un sujeto con mayor riesgo de trombosis o episodio aterotrombótico, que comprende: (a) someter una muestra de prueba del sujeto a al menos un análisis para determinar los alelos de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en 10 las SECUENCIAS ID NO 22 y 25; y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 y las variantes alélicas principales de la SECUENCIA ID NO 25, y, si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo seleccionar entonces una terapia antiplaquetaria única como un régimen de tratamiento en la prevención primaria de un episodio cardiovascular o una terapia antiplaquetaria dual como un régimen de tratamiento en la prevención secundaria 15 de un episodio cardiovascular.

11. Un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento para un individuo con mayor riesgo de trombosis o un episodio aterotrombótico, comprendiendo el ensayo: (a) someter una muestra de prueba del sujeto a al menos un análisis para determinar los alelos de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en las 20 SECUENCIAS ID NO 22 y 25; y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas menores de la SECUENCIA ID NO 22 y las variantes alélicas principales de la SECUENCIA ID NO 25, y, si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo seleccionar entonces una dosis alta de terapia antiplaquetaria.

25 12. Un ensayo para seleccionar un régimen de tratamiento para un individuo sometido a tratamiento con un medicamento que influye en la hemostasia: (a) someter una muestra de prueba del sujeto a al menos un análisis para determinar los alelos de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SECUENCIAS ID NO 22 y 25; y (b) comparar el al menos un alelo identificado con una lista de alelos de alto riesgo correspondientes seleccionados de las variantes alélicas principales de la SECUENCIA ID NO 22 y las variantes alélicas menores de la 30 SECUENCIA ID NO 25, y si la muestra biológica comprende uno o más de los alelos de riesgo seleccionar entonces un tratamiento que no incluya un agente antiplaquetario.

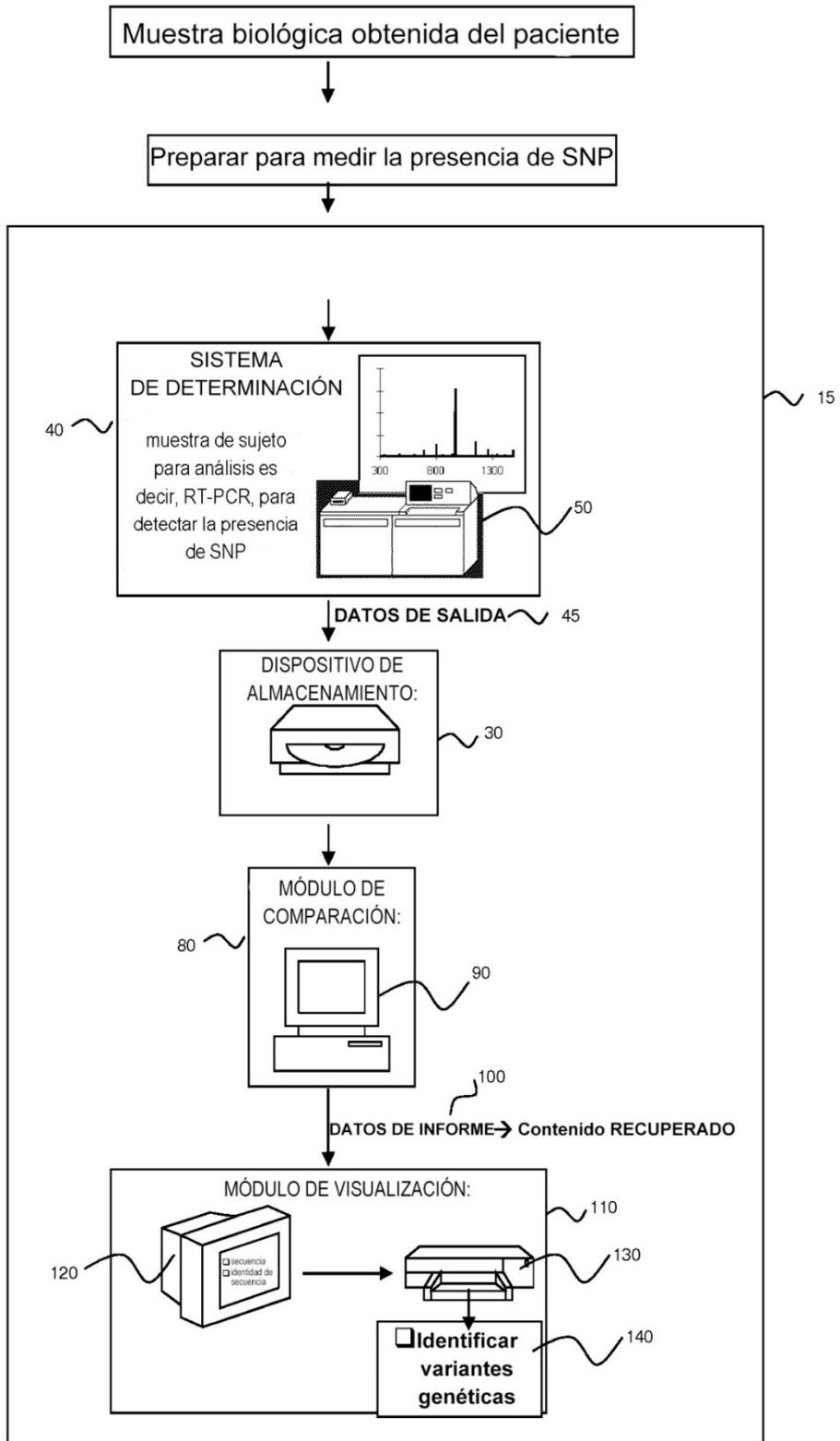


Figura 1