



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 346 881**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04721788 .0**

(96) Fecha de presentación : **19.03.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1618208**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

(54) Título: **Haplotipos del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) útiles como indicadores de resultado del paciente.**

(30) Prioridad: **19.03.2003 US 455550 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2010

(73) Titular/es: **The University of British Columbia
University-Industry Liaison Office
No. 103-6190 Agronomy Road
Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, CA**

(72) Inventor/es: **Russell, James, A. y
Walley, Keith, R.**

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Haplotipos del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) útiles como indicadores de resultado del paciente.

Datos de solicitudes relacionadas

Esta solicitud se refiere a la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/455.550 presentada el 19 de marzo de 2003.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de evaluación y tratamiento de pacientes y más específicamente a la determinación de un genotipo de paciente para uno o más polimorfismos para determinar el pronóstico del paciente y para determinar terapia.

Antecedentes de la invención

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) se caracteriza por un aumento de la inflamación (procesos antiinflamatorios), aumento de la coagulación (procesos anti-coagulantes) y disminución de la fibrinólisis (SUFFREDINI AF y col. *New England Journal of Medicine* (1989) 320(18):1165-72; HESSELVIK JF y col. *Critical Care Medicine* (1989) 17(8):724-33; PHILIPPE J y col. *Thrombosis & Haemostasis* (1991) 65(3):291-5; LORENTE JA y col. *Chest* (1993) 103(5):1536-42; FOURRIER F y col. *Chest* (1992) 101(3):816-23; MESTERS RM y col. (1996) 88(3):881-6). Los estímulos sépticos y no sépticos tales como endotoxina bacteriana y derivación cardiopulmonar (DCP) participan en la activación del sistema de coagulación y desencadenan un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). El inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) está asociado a la disminución de fibrinólisis (BINDER BR y col. *News in Physiological Sciences* (2002) 17:56-61). Los niveles de PAI-1 se notifican aumentados en pacientes con sepsis (MESTERS RM y col. *Thrombosis & Haemostasis*. (1996) 75(6):902-7; PRALONG G y col. *Thrombosis & Haemostasis*. (1989) 61(3):459-62), en meningococcemia (HERMANS PW y col. *Lancet*. (1999) 354(9178):556-60) y en traumatismo (MENGES T y col. *Lancet* (2001) 357(9262):1096-7). Además, el aumento de los niveles de PAI-1 está asociado a la disminución de la supervivencia y al aumento de disfunción de órganos (MESTERS RM y col. (1996); PRALONG G y col. (1989)).

El gen PAI-1 humano está mapeado en el cromosoma 7q21-q22 y se extiende en aproximadamente 12 kb. Una secuencia del gen PAI-1 de *Homo sapiens* representativa se incluye en el GenBank bajo el número de registro AF386492 (mostrada en este documento como LA SEQ ID NO.: 1). DAWSON y col. (*Journal of Biological Chemistry* (1993) 268(15):10739-45) identificaron un polimorfismo de inserción/delección (4G/5G) en la posición - 675 de la secuencia promotora de PAI-1 que se corresponde con la posición 837 de LA SEQ ID NO.: 1. El alelo 4G es un polimorfismo promotor de la delección de un único par de bases del gen PAI-1 y está asociado al aumento de niveles de proteína de PAI-1 (DAWSON SJ y col. (1993); DAWSON SJ y col. *Arteriosclerosis & Thrombosis* (1991) 11(1):183-90). El alelo 4G de este polimorfismo de un único nucleótido (SNP) está asociado al aumento de riesgo de trombosis venosa profunda (SEGUI R y col. *British Journal of Haematology* (2000) 111(1):122-8), accidente cerebrovascular (HINDORFF LA y col. *Journal of Cardiovascular Risk* (2002) 9(2):131-7), infarto de miocardio agudo (BOEKHOLDT SM y col. *Circulation* (2001) 104(25):3063-8; ERIKSSON P y col. *PNAS* (1995) 92(6):1851-5), pérdida tardía de la luz después de sustitución de prótesis endovascular de la arteria coronaria (ORTLEPPG JR y col. *Clinical Cardiology* (2001) 24(9):585-91) y muerte súbita cardíaca (ANVARI A y col. *Thrombosis Research* (2001) 103(2):103-7; MIKKELSSON J y col. *Thrombosis & Haemostasis* (2000) 84(1):78-82). En el enfermo crítico, el alelo 4G también está asociado a la disminución de supervivencia en pacientes que han tenido traumatismo grave (MENGES T y col. *Lancet* (2001) 357(9262):1096-7) y pacientes que tuvieron meningococcemia (HERMANS PW y col. *Lancet*. (1999) 354(9178):556-60), además de al aumento de riesgo de choque en pacientes que tuvieron meningococcemia (WESTENDORP RG y col. *Lancet* (1999) 354(9178):561-3). El genotipo 4G de PAI-1 también se ha asociado a resultados adversos del paciente (MENGES y col. (2001); HERMANS y col. (1999); WESTENDORP RG y col. (1999); ENDLER G y col. *British Journal of Haematology* (2000) 110(2):469-71; GARDEMANN A y col. *Thrombosis & Haemostasis* (1999) 82(3):1121-6; HOOPER WC y col. *Thrombosis Research* (2000) 99(3):223-30; JONES K y col. *European Journal of Vascular & Endovascular Surgery* (2002) 23(5):421-5; HARALAMBOUS E. y col. *Crit Care Med* (2003) 31(12):2788-93; y ROEST M y col. *Circulation* (2000) 101(1):67-70). El genotipo 4G/4G de PAI-1 se asoció a niveles de PAI-1 en pacientes que padecían lesión pulmonar aguda (RUSSELL JA *Crit Care Med*. (2003) 31(4):S243-S247).

Además, un polimorfismo en la posición 14.699 del gen PAI-1 se ha ligado a hipertensión pulmonar primaria (BENZA y col.: "Association of a Gene Polymorphism with Primary Pulmonary Hypertension", *Cardiopulmonary Critical Care Newsletter*).

Resumen de la invención

Esta invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que el polimorfismo promotor 4G/5G del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) no es un factor pronóstico tan exacto del resultado del paciente como el SNP en la posición 12580 de SEQ ID NO: 1. Además, se identifican diversos otros polimorfismos de PAI-1 en desequilibrio de enlace (DE) total con SNP 12580 como útiles para el cribado de pacientes, como una indicación de resultado del paciente o para el pronóstico de la recuperación de una afección inflamatoria o para confeccionar terapia

ES 2 346 881 T3

para pacientes con afecciones inflamatorias o para la selección de terapias para pacientes basadas en su genotipo y haplotipo 12580 de PAI-1. Sorprendentemente, los SNP identificados en este documento como factores pronósticos de resultado del paciente también se corresponden con niveles de PAI-1 más bajos.

5 Según un aspecto de la invención, se proporcionan métodos para obtener un pronóstico para un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria, comprendiendo el método determinar un genotipo que incluye uno o más sitios de polimorfismo en el gen PAI-1 para el paciente, en el que dicho genotipo es indicativo de una capacidad del paciente para recuperarse de una afección inflamatoria y siempre que el genotipo seleccionado no se corresponda con sólo la posición 837 de LA SEQ ID NO.: 1.

10 Según otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para obtener un pronóstico para un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria, comprendiendo el método determinar un genotipo de uno o más sitios de polimorfismo en el gen PAI-1 para el paciente seleccionados de los sitios de polimorfismo correspondientes a las posiciones 664, 2037, 2362, 2852, 5834, 5878, 7343, 13605, 7365, 7729, 7771, 12750, 4588, 5404, 5686, 5984, 11312, 2846, 6821, 9759, 10381, 7365, 7729, 7771, 12750, 4588, 5404, 5686, 5984, 11312, 5645, 7121, 7437, 8070, 8406, 9463, 9466, 12219, 12580, 13889, 14440, en el que dicho genotipo es indicativo de una capacidad del paciente para recuperarse de una afección inflamatoria.

20 Según un aspecto de la invención se proporcionan métodos para obtener un pronóstico para un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria, comprendiendo el método determinar un genotipo que incluye uno o más sitios de polimorfismo en el gen PAI-1 del paciente, en el que dicho genotipo es indicativo de una capacidad del paciente para recuperarse de una afección inflamatoria y el polimorfismo se selecciona de la región definida por las posiciones 1581 a 14544 de LA SEQ ID NO.: 1.

25 El sitio del polimorfismo puede corresponderse con la posición 12580 de la SEQ ID NO.: 1 o un sitio de polimorfismo ligado al mismo. Alternativamente, el sitio del polimorfismo puede corresponderse con las posiciones 5645, 7121, 7437, 8070, 8406, 9463, 9466, 12219, 13889 ó 14440 en la SEQ ID NO: 1.

30 El genotipo también puede determinarse en una combinación de sitios de polimorfismo múltiple, seleccionándose la combinación del grupo de posiciones correspondientes con la SEQ ID NO: 1 que está constituido por:

	664 y 2037;			
35	664 y 2362;			
	664 y 2852;			
	664 y 5834;			
40	837 y 2037;			
	837 y 2362;			
	837 y 2852;			
45	837 y 5834;			
	una de 5878	y una 7365	y una 4588	
		de	de	
50	7343	7729	5404	
	13605	7771	5686	
		12750	5984	
55			11312; y	
	una de 2846 y 10381	y una 7365	y una 4588	
		de	de	
60	6821	7729	5404	
	9759	7771	5686	
		12750	5984	
65			11312.	

ES 2 346 881 T3

Alternativamente, los genotipos pueden determinarse para el polimorfismo localizado dentro de 1581-14544 de la SEQ ID NO: 1, para excluir polimorfismos dentro de la región promotora. Preferentemente, los genotipos se determinarían para polimorfismos seleccionados del grupo que está constituido por 5645, 7121, 7437, 8070, 8406, 9463, 9466, 12219, 12580, 13889 ó 14440 o la SEQ ID NO: 1.

5

Según otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para comparar adicionalmente el genotipo así determinado con genotipos conocidos que son indicativos de un pronóstico para la recuperación de la misma afección inflamatoria en lo que respecta al paciente u otra afección inflamatoria.

10

El genotipo del paciente puede ser indicativo de una disminución de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria o indicativo de un pronóstico de disfunción cardiovascular o respiratoria grave en pacientes críticamente enfermos. Además, un genotipo tal puede seleccionarse del grupo de sitios de polimorfismo único y sitios de polimorfismo combinado constituidos por:

15

5645 T;

7121 G;

20

7437 T;

8070 A;

8406 C;

25

9463 G;

9466 T;

12219 C;

30

12580 G;

13889 C;

14440 A;

35

664 A y 2037 T;

664 A y 2362 -;

664 A y 2852 A;

40

664 A y 5834 A;

837 - y 2037 T;

837 - y 2362-;

45

837 - y 2852 A; y

837 - y 5834 A.

50

El genotipo del paciente puede ser indicativo de un aumento de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria o indicativo de un pronóstico de disfunción cardiovascular o respiratoria menos grave en pacientes críticamente enfermos. Además, un genotipo tal puede seleccionarse del grupo de sitios de polimorfismo único y sitios de polimorfismo combinado constituidos por:

55

5645 C;

7121 A;

60

7437 C;

8070 G;

8406 T;

65

9463 A;

ES 2 346 881 T3

9466 C;
 12219 T;
 12580 T;
 13889 T;
 14440 G;
 una 5878 G y una de 7365 T y una 4588 T
 de de
 7343 G 7729 + 5404 G
 13605 A 7771 A 5686 A
 12750 A 5984 A
 11312 A; y
 una 2846 A y 10381 T y una 7365 T y una 4588 T
 de de de
 6821 T 7729 + 5404 G
 9759 G 7771 A 5686 A
 12750 A 5984 A
 11312 A.

Según otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para identificar un polimorfismo en una secuencia del gen PAI-1 que guarda relación con el pronóstico del paciente. En el que el método comprende obtener información de la secuencia del gen PAI-1 de un grupo de pacientes, identificar un sitio de al menos un polimorfismo en el gen PAI-1, determinar genotipos en el sitio para pacientes individuales en el grupo, determinar una capacidad de pacientes individuales en el grupo para recuperarse de la afección inflamatoria y correlacionar genotipos determinados con paciente con posibles terapias.

El método de correlación puede repetirse en una población de pacientes de tamaño suficiente para lograr una correlación estadísticamente significativa.

Los métodos pueden comprender adicionalmente etapas de obtener la secuencia del gen PAI-1 del paciente u obtener una muestra de ácido nucleico del paciente. La determinación del genotipo puede realizarse en una muestra de ácido nucleico del paciente.

Si el genotipo del paciente correspondiente al nucleótido en la posición 12580 es G, el pronóstico puede ser indicativo de una disminución de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria o de disfunción cardiovascular o respiratoria grave en pacientes críticamente enfermos.

Si el genotipo del paciente correspondiente al nucleótido en la posición 12580 es T, el pronóstico puede ser indicativo de un aumento de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria o de disfunción cardiovascular o respiratoria menos grave en pacientes críticamente enfermos.

La afección inflamatoria puede seleccionarse del grupo constituido por: sepsis, septicemia, neumonía, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome disneico agudo (SDA), lesión pulmonar aguda, infección, pancreatitis, bacteriemia, peritonitis, absceso abdominal, inflamación debida a traumatismo, inflamación debida a cirugía, enfermedad inflamatoria crónica, isquemia, lesión por isquemia-reperusión de un órgano o tejido, lesión de tejido debida a una enfermedad, lesión de tejido debida a quimioterapia o radioterapia y reacciones a sustancias ingeridas, inhaladas, infundidas, inyectadas o administradas, glomerulonefritis, infección intestinal, infecciones oportunistas y para pacientes que se someten a cirugía mayor o diálisis, pacientes que son inmunodeprimidos, pacientes con agentes inmunosupresores, pacientes con VIH/SIDA, pacientes con presunta endocarditis, pacientes con fiebre, pacientes con fiebre de origen desconocido, pacientes con fibrosis quística, pacientes con diabetes mellitus, pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes con bronquiectasia, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfisema o asma, pacientes con neutropenia febril, pacientes con meningitis, pacientes con artritis séptica, pacientes con infección de las vías urinarias, pacientes con fascitis necrosante, pacientes con otra presunta infección por estreptococos del grupo A, pacientes que han tenido una esplenectomía, pacientes con infección recurrente o presunta por enterococos, otras afecciones médicas y quirúrgicas asociadas al aumento de riesgo de infección, sepsis

por grampositivos, sepsis por gramnegativos, sepsis con cultivo negativo, sepsis fúngica, meningococcemia, síndrome pos-bomba, síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, hepatitis, epiglotitis, *E. coli* 0157:H7, malaria, gangrena gaseosa, síndrome de choque tóxico, tuberculosis micobacteriana, neumonía por *Pneumocystis*, neumonía, leishmaniosis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, fiebre hemorrágica del dengue, enfermedad inflamatoria pélvica, legionela, enfermedad de Lyme, gripe A, virus de Epstein-Barr, encefalitis, enfermedades inflamatorias y autoinmunidad incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, vasculitis sistémica, granulomatosis de Wegener, trasplantes que incluyen corazón, hígado, pulmón, riñón, médula ósea, enfermedad de injerto frente a huésped, rechazo de trasplante, anemia de células falciformes, síndrome nefrótico, toxicidad de agentes tales como OKT3, terapia con citocinas, y cirrosis.

La determinación de un genotipo puede comprender uno o más de: análisis de la longitud de fragmentos de restricción; secuenciación; hibridación; ensayo de ligadura de oligonucleótidos; amplificación por ligadura-círculo rodante; ensayo de nucleasa en 5'; métodos de corrección de lectura por polimerasa; PCR específica de alelos; y datos de secuencias de lectura.

Según otro aspecto de la invención se proporciona un kit para determinar un genotipo en una posición de nucleótido definida dentro de un sitio de polimorfismo en una secuencia del gen PAI-1 de un paciente para proporcionar un pronóstico de la capacidad del paciente para recuperarse de una afección inflamatoria, comprendiendo el kit en un envase una enzima de restricción que puede distinguir nucleótidos alternos en el sitio de polimorfismo o un oligonucleótido marcado que tiene suficiente complementariedad con el sitio de polimorfismo y que puede distinguir dichos nucleótidos alternos.

Los nucleótidos alternos pueden corresponderse con la posición 12580 de SEQ ID NO: 1, la posición 10 de la SEQ ID NO: 2 o con un polimorfismo ligado a las mismas. Los nucleótidos alternos también pueden corresponderse con una o más de las posiciones 5645, 7121, 7437, 8070, 8406, 9463, 9466, 12219, 13889 ó 14440 de la SEQ ID NO: 1.

El kit que comprende una enzima de restricción también puede comprender un oligonucleótido o un conjunto de oligonucleótidos adecuado para amplificar una región que rodea el sitio de polimorfismo, un agente de polimerización e instrucciones para usar el kit para determinar el genotipo.

Según otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para determinar el pronóstico del paciente en un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria, comprendiendo el método detectar la identidad de uno o más polimorfismos en la región promotora de PAI-1, en el que la identidad de dichos uno o más polimorfismos es indicativa de la capacidad del paciente para recuperarse de la afección inflamatoria.

Según otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para cribar pacientes, comprendiendo las etapas de (a) obtener información de la secuencia del gen PAI-1 de un paciente y (b) determinar la identidad de uno o más polimorfismos en la región promotora, en el que el uno o más polimorfismos pueden ser indicativos de la capacidad de un paciente para recuperarse de una afección inflamatoria.

Según otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para cribar pacientes, por lo que el método incluye las etapas de (a) seleccionar un paciente basándose en el riesgo de desarrollar una afección inflamatoria o que tiene una afección inflamatoria, (b) obtener información de la secuencia del gen PAI-1 del paciente y (c) detectar la identidad de uno o más polimorfismos en el gen PAI-1, en el que el polimorfismo es indicativo de la capacidad de un paciente para recuperarse de una afección inflamatoria.

Según otro aspecto de la invención se proporcionan métodos para seleccionar un grupo de pacientes para determinar la eficacia de un fármaco candidato conocido o presunto de ser útil para el tratamiento de una afección inflamatoria, incluyendo el método determinar un genotipo para uno o más sitios de polimorfismo en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno 1 para cada paciente, en el que dicho genotipo es indicativo de la capacidad del paciente para recuperarse de la afección inflamatoria y clasificar pacientes basándose en su genotipo, siempre que el sitio de polimorfismo no sea únicamente un polimorfismo en un sitio correspondiente a la posición 837 de LA SEQ ID NO.: 1.

El método puede incluir la etapa adicional de comparar la respuesta del paciente al fármaco candidato basándose en el genotipo del paciente. La respuesta al fármaco candidato puede decidirse determinando cada capacidad del paciente para recuperarse de la afección inflamatoria.

Las posiciones de secuencia anteriores se refieren a la cadena de transcripción del gen PAI-1. Será obvio para un experto en la materia que el análisis podría realizarse en la cadena complementaria para determinar el resultado del paciente.

Un resultado o pronóstico del paciente más grave puede correlacionarse con menor expresión de PAI-1 o a la inversa una indicación de resultado o pronóstico del paciente menos grave pueden correlacionarse con mayor expresión de PAI-1, que es lo contrario de lo que se esperaría.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Muestra un mapa de haplotipos del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) en caucásicos en el que las columnas indican loci polimórficos y las filas indican distintos haplotipos. Las celdas claras representan alelos raros y las celdas oscuras representan alelos comunes.

Los polimorfismos que proporcionan la misma información que el alelo 12580 G se eligieron basándose en este mapa de haplotipos. Estos polimorfismos proporcionan la misma información que el alelo 12580 G.

Figura 2. Muestra los subtipos de haplotipos de PAI-1 en un árbol filogenético sin enraizar que indica las posiciones de los haplotipos de la Figura 1. La Figura 2 se dibujó usando MEGA II en la que la longitud de la línea refleja la distancia evolutiva relativa y cada subtipo es un círculo.

Figura 3. Muestra la supervivencia en hospital para cada uno de los subtipos de haplotipos del gen PAI-1. Las barras de error indican intervalos de confianza del 95%. Los haplotipos que contienen el alelo 4G están compuestos por 2 subtipos de haplotipos separados definidos por: el alelo 13985 T y el alelo 12580 G. La media del grupo, excluyendo el subtipo de haplotipo 4G que contiene el alelo 12580 G, se ilustra por la línea horizontal. La media y el intervalo de confianza del 95% para el subtipo de haplotipos definido por el alelo 12580 G está por debajo de la media del resto del grupo. A diferencia, el subtipo de haplotipo 4G que contiene el alelo 13985 T tiene la mayor supervivencia en hospital de cualquier haplotipo. Los datos de pacientes se incluyeron dos veces, una vez para cada haplotipo que poseían (los homocigotos para un haplotipo se incluyeron dos veces en ese haplotipo), de manera que el número de haplotipos (números dentro de las barras de datos) ascienden a 2 veces el número total de pacientes (235).

Figura 4. Muestra días vivo y libre (DAF) de insuficiencia de sistemas de órganos durante el periodo de estudio de 28 días por genotipo para el alelo 12580 de PAI-1.

Figura 5. Muestra días vivo y libre de cumplimiento de 2, 3 ó 4 de 4 (2/4, 3/4 ó 4/4) criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) mediante el genotipo 12580 de PAI-1. Los criterios de SRIS son: 1) taquicardia (frecuencia cardíaca >100 lpm en ausencia de bloqueadores beta), 2) taquipnea (frecuencia respiratoria > 20 respiraciones/min) o mecánicamente ventilado, 3) fiebre (temperatura > 38°C) o hipotermia (temperatura < 35,5°C) y 4) leucocitosis (recuento de leucocitos total > 11.000/ μ l), usando las directrices establecidas en The American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis (*Critical Care Medicine*. (1992) 20(6):864-74). Cada día que un paciente estuvo en la UCI se puntuó la presencia o ausencia de cada uno de los criterios de SRIS de forma que coincidió el número total de criterios de SRIS cumplidos cada día en la UCI. Debido a que el cumplimiento de criterios de SRIS indica un escaso resultado, más días vivo y libre de cumplimiento de criterios de SRIS indica un mejor resultado.

Figura 6. Muestra la aparición de sepsis y choque séptico mediante el genotipo para el alelo 12580 de PAI-1.

Figura 7A. Muestra días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica mediante el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado) en 587 caucásicos críticamente enfermos con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).

Figura 7B. Muestra días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica mediante el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT) en 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 8A. Muestra días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica mediante el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 (4G/4G, 4G/5G y 5G/5G por separado) en 314 caucásicos críticamente enfermos con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).

Figura 8B. Muestra días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica mediante el alelo 4G/5G (837) de PAI-1 (cualquier 4G frente a 5G/5G) en 314 caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 9A. Muestra días vivo y libre de lesión pulmonar aguda (LPA) y la relación de P_aO_2/F_iO_2 (P/F) superior a 300 mm de Hg mediante el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado) en 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 9B. Muestra días vivo y libre de lesión pulmonar aguda y P_aO_2/F_iO_2 < 300 mm de Hg mediante el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT) para 587 caucásicos con SRIS.

Figura 10A. Muestra días vivo y libre de lesión pulmonar aguda (LPA) y la relación de P_aO_2/F_iO_2 (P/F) superior a 300 mm de Hg mediante el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 (4G/4G, 4G/5G y 5G/5G por separado) en 314 caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 10B. Muestra días vivo y libre de lesión pulmonar aguda y P_aO_2/F_iO_2 < 300 mm de Hg mediante el alelo 4G/5G de PAI-1 (cualquier 4G frente a 5G/5G) en 314 caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 11A. Muestra días vivo y libre de uso de esteroides mediante el genotipo 12580 de PAI-1 en 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS. Pacientes con 2 copias del alelo 12580 G (N=98) tuvieron el menor días vivo y libre de uso de esteroides (15 días).

Figura 11B. Muestra días vivo y libre de uso de esteroides mediante el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT) para 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 12B. Muestra días vivo y libre de uso de esteroides mediante el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 en caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 12B. Muestra días vivo y libre de uso de esteroides mediante el alelo 4G/5G (837) de PAI-1 en 314 caucásicos críticamente enfermos con SRIS.

Figura 13A. Muestra niveles medios en suero de PAI-1 preoperatorios en 24 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado).

Figura 13B. Muestra niveles medios de PAI-1 en suero preoperatorios en 24 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT).

Figura 14A. Muestra niveles de PAI-1 en suero medidos 4 horas posoperatorio en 55 pacientes caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar agrupados por 4G/5G de PAI-1.

Figura 14B. Muestra niveles de PAI-1 en suero medidos 4 horas posoperatorio en 55 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por 4G/5G de PAI-1.

Figura 15A. Muestra niveles medios de PAI-1 en suero de 67 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba recogidos 3 horas pos-cirugía agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (TT, GT y GG por separado).

Figura 15B. Muestra niveles medios de PAI-1 en suero de 67 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba recogidos 3 horas posoperatorio agrupados por 12580 GG/GT frente a TT.

Figura 16. Muestra diferencias medias en niveles de PAI-1 en suero de preoperatorio a 3 horas posoperatorio en 24 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por PAI-1 12580 GG, GT y TT.

Figura 17A. Muestra el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) 4 horas posoperatorio en 66 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado).

Figura 17B. Muestra el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) 4 horas posoperatorio en 66 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT).

Figura 18A. Muestra el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) 4 horas posoperatorio en 364 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 (4G/4G, 4G/5G y 5G/5G por separado).

Figura 18B. Muestra el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) 4 horas posoperatorio en 364 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el alelo 4G/5G (837) de PAI-1 (cualquier 4G frente a 5G/5G).

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

En la siguiente descripción se usan ampliamente varios términos, las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de la invención.

“Material genético” incluye cualquier ácido nucleico y puede ser un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma tanto mono como bicatenaria.

Una “purina” es un compuesto orgánico heterocíclico que contiene anillos de pirimidina e imidazol condensados y sirve de compuesto parental para bases de purina, adenina (A) y guanina (G). “Nucleótidos” son generalmente una base de purina (R) o pirimidina (Y) ligadas covalentemente a una pentosa, normalmente ribosa o desoxirribosa, en los que el azúcar lleva uno o más grupos fosfato. Los ácidos nucleicos son generalmente un polímero de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster en 3' 5'. Como se usa en este documento, “purina” se usa para referirse a las bases de purina,

A y G, y más ampliamente para incluir los monómeros de nucleótidos, desoxiadenosina-5'-fosfato y desoxiguanosina-5'-fosfato, como componentes de una cadena de polinucleótidos.

Una “pirimidina” es una base orgánica de un único anillo que forma bases de nucleótidos, citosina (C), timina (T) y uracilo (U). Como se usa en este documento, “pirimidina” se usa para referirse a las bases de pirimidina, C, T y U, y más ampliamente para incluir los monómeros de nucleótidos de pirimidina que junto con los nucleótidos de purina son los componentes de una cadena de polinucleótidos.

Un “sitio polimórfico” o “sitio de polimorfismo” o “polimorfismo” o “sitio de polimorfismo de un único nucleótido” (sitio de SNP) como se usa en este documento es el locus o posición en una secuencia dada en la que se produce divergencia. Un “polimorfismo” es la aparición de dos o más formas de un gen o posición dentro de un gen (alelo) en una población en frecuencias tales que la presencia de la forma más rara no puede explicarse sólo por mutación. La implicación es que alelos polimórficos confieren alguna ventaja selectiva al huésped. Los sitios polimórficos preferidos tienen al menos dos alelos, produciéndose cada uno a una frecuencia superior al 1%, y más preferentemente superior al 10% o 20% de una población seleccionada. Los sitios de polimorfismo pueden estar en posiciones conocidas dentro de una secuencia de ácidos nucleicos o puede determinarse que existen usando los métodos descritos en este documento. Los polimorfismos pueden producirse tanto en las regiones codificantes como en las regiones no codificantes (por ejemplo, promotores aguas arriba) de genes.

Un “subtipo” es un grupo de haplotipos que están íntimamente relacionados filogenéticamente. Por ejemplo, si los haplotipos se muestran en un árbol filogenético (evolutivo), un subtipo incluye todos los haplotipos contenidos dentro de la misma rama.

Como se usa en este documento, “haplotipo” es un conjunto de alelos de loci íntimamente ligados en un cromosoma que tienden a ser heredados juntos; comúnmente se usan en referencia a los genes ligados del complejo mayor de histocompatibilidad.

Como se usa en este documento, “desequilibrio de enlace” es la aparición en una población de ciertas combinaciones de alelos ligados en mayor proporción que la esperada de las frecuencias de alelos en el loci.

Se han identificado otros numerosos sitios como polimorfismos en el gen PAI-1, en los que los aquellos polimorfismos están ligados al polimorfismo en la posición 12580 de la SEQ. ID NO: 1 y, por tanto, pueden ser indicativos del pronóstico del paciente. Los siguientes sitios de polimorfismo único y sitios de polimorfismo combinado están ligados a 12580 de la SEQ. ID NO.: 1:

5645;
7121;
7437;
8070;
8406;
9463;
9466;
12219;
13889;
14440;
664 y 2037;
664 y 2362;
664 y 2852;
664 y 5834;
837 y 2037;
837 y 2362;
837 y 2852; y
837 y 5834.

ES 2 346 881 T3

Un experto en la materia apreciará que podrán determinarse otros sitios de polimorfismo único ligados y sitios de polimorfismo combinado. El haplotipo de PAI-1 puede crearse evaluando los SNP de PAI-1 en sujetos normales usando un programa que tiene un algoritmo de maximización de la esperanza (es decir, PHASE). Un haplotipo construido de PAI-1 puede usarse para encontrar combinaciones de SNP que están en desequilibrio de enlace (DE) total con 12580.

5 Por tanto, el haplotipo de un individuo podría determinarse genotipando otros SNP que están en DE total con 12580. Los sitios de polimorfismo único ligados o los sitios de polimorfismo combinado también pueden genotiparse para evaluar el pronóstico del paciente.

10 Los siguientes genotipos para sitios de polimorfismo único y sitios de polimorfismo combinado pueden ser indicativos de una disminución de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria o indicativos de disfunción cardiovascular o respiratoria grave en pacientes críticamente enfermos:

5645 T;
15 7121 G;
7437 T;
8070 A;
20 8406 C;
9463 G;
9466 T;
25 12219 C;
12580 G;
13889 C;
30 14440 A;
664 A y 2037 T;
664 A y 2362 -;
35 664 A y 2852 A;
664 A y 5834 A;
837 - y 2037 T;
40 837 - y 2362 -;
837 - y 2852 A; y
837 - y 5834 A.
45

Mientras, los siguientes genotipos para sitios de polimorfismo único y sitios de polimorfismo combinado pueden ser indicativos de un aumento de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria o indicativos de disfunción cardiovascular o respiratoria menos grave en pacientes críticamente enfermos:

50 5645 C;
7121 A;
7437 C;
55 8070 G;
8406 T;
9463 A;
60 9466 C;
12219 T;
12580 T;
65 13889 T;
14440 G;

ES 2 346 881 T3

una 5878 G y una 7365 T y una de 4588 T
 de de
 5 7343 G 7729 + 5404 G
 13605 A 7771 A 5686 A
 12750 A 5984 A
 11312 A; y
 10 una 2846 A y 10381 T y una 7365 T y una de 4588 T
 de de
 15 6821 T y 10381 T 7729 + 5404 G
 9759 G y 10381 T 7771 A 5686 A
 12750 5984 A
 A
 20 11312 A.
 (en la que un "+" representa una inserción y un "-"
 representa una delección)

25 Un experto en la materia apreciará que las designaciones numéricas de las posiciones de polimorfismos dentro de una secuencia son respecto a la secuencia específica. Por tanto, las mismas posiciones pueden asignarse a designaciones numéricas diferentes dependiendo de la forma en la que la secuencia esté numerada y la secuencia elegida como se ilustra por la numeración alternativa de polimorfismo equivalente en DAWSON y col. (1993), anteriormente.
 30 Además, las variaciones de secuencia dentro de la población tales como inserciones o delecciones pueden cambiar la posición relativa y posteriormente las designaciones numéricas de nucleótidos particulares en y alrededor de un sitio de polimorfismo.

La TABLA 1A más adelante es representativa de un inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) de *Homo sapiens* o secuencia génica del miembro 1 del subtipo E del inhibidor de proteinasa de serina-cisteína (SERPINE1) y comprende una secuencia como se enumera en GenBank bajo el número de registro AF386492. El polimorfismo 4G/5G de PAI-1 se corresponde con el SNP descrito como -675 G/- usando el sistema de numeración de DAWSON y col. (1993) que se corresponde con la posición 837 en la TABLA 1A (SEQ ID NO: 1). Los sitios de polimorfismo mostrados a continuación en la TABLA 1A están en negrita y subrayados. Los sitios de polimorfismo están representados por su alelo principal (celdas oscuras en la Figura 1). Los alelos principales y secundarios para cada uno de los sitios de polimorfismo primarios del gen PAI-1 son del siguiente modo:

en la posición 5445 el nucleótido más común (alelo principal) es **g** y el alelo secundario es **a**;
 45 en la posición 837 el nucleótido más común (alelo principal) es **g** y el alelo secundario es **-**;
 en la posición 5445 el nucleótido más común (alelo principal) es **c** y el alelo secundario es **t**;
 en la posición 7121 el nucleótido más común (alelo principal) es **a** y el alelo secundario es **g**;
 50 en la posición 7437 el nucleótido más común (alelo principal) es **c** y el alelo secundario es **t**;
 en la posición 8070 el nucleótido más común (alelo principal) es **g** y el alelo secundario es **a**;
 55 en la posición 8406 el nucleótido más común (alelo principal) es **t** y el alelo secundario es **c**;
 en la posición 9463 el nucleótido más común (alelo principal) es **a** y el alelo secundario es **g**;
 en la posición 9466 el nucleótido más común (alelo principal) es **c** y el alelo secundario es **t**;
 60 en la posición 12219 el nucleótido más común (alelo principal) es **t** y el alelo secundario es **c**;
 en la posición 12580 el nucleótido más común (alelo principal) es **t** y el alelo secundario es **g**;
 65 en la posición 13889 el nucleótido más común (alelo principal) es **t** y el alelo secundario es **c**;
 en la posición 14440 el nucleótido más común (alelo principal) es **g** y el alelo secundario es **a**.

ES 2 346 881 T3

TABLA 1A

	1	cgtaactggtc	catagcctgt	taggaaccag	gctgcataac	aggaggtgag	tggcaggtga
5	61	gtgaaatttc	atctgtagtt	acagccactc	ctcatcactc	gcattaccac	cagagctcca
	121	ctccctgtca	gatcagcggc	ggcattagat	tctcatagga	gctcgaaccc	tattctaaac
	181	tgttcattgt	agggatctag	gttgcaagct	ccctatgaga	atctaattgcc	tgatgatctg
10	241	tcacgggtctc	ccatcacccc	tagatgggac	catctagttg	caggaaaaca	agctcagggc
	301	tcccaactgat	tctacacgat	ggtgaattgt	ggaattatit	cattatataat	attacaatgt
	361	aataataata	gaaataaagc	acacaataaa	tgtaattgtc	ttgaatcatc	ccgaaacccat
	421	cccaccctgg	tctgtgaaaa	aattgtcttc	catgaaacca	gtccctgggtg	ccaaaaacgt
15	481	tgaggaccac	tgctccacag	aattctatcgg	tcactcttcc	tccctccacc	cccttgccct
	541	aaaagcacac	cctgcaaacc	tgccatgaat	tgacactctg	tttctatccc	ttttccctt
	601	gtgtctgtgt	ctggaggaag	aggataaagg	acaagctgcc	ccaagtccta	gcgggcagct
20	661	cgaggaagtg	aaacttacac	gttgggtctcc	tgtttcctta	ccaagctttt	accatggtaa
	721	cccctgggtcc	cgttcagcca	ccaccacccc	acccagcaca	cctccaacct	cagccagaca
	781	aggttgttga	cacaagagag	ccctcagggg	cacagagaga	gtctggacac	gtgggggagt
	841	cagccgtgta	tcctcggagg	cgcccgggca	catggcaggg	atgagggaaa	gaccaagagt
25	901	cctctgttgg	gcccaggtcc	tagacagaca	aaacctagac	aatcacgtgg	ctggctgcat
	961	gccctgtggc	tggtgggctg	ggcccaggag	gagggagggg	cgctctttcc	tggaggtggt
	1021	ccagagcacc	gggtggacag	ccctggggga	aaacttcac	gttttgatgg	aggttatctt
30	1081	tgataactcc	acagtgcact	ggttcgcca	aggaaaagca	ggcaacgtga	gctgtttttt
	1141	ttttctccaa	gctgaacact	aggggtccta	ggcttttttg	gtcaccgggc	atggcagaca
	1201	gtcaacctgg	caggacatcc	gggagagaca	gacacaggca	gagggcagaa	aggtcaaggg
	1261	aggttctcag	gccaaaggcta	ttgggggttg	ctcaattgtt	cctgaatgct	cttacacacg
35	1321	tacacacaca	gagcagcaca	cacacacaca	cacacacatg	cctcagcaag	tcccagagag
	1381	ggaggtgtcg	agggggaccc	gctggctgtt	cagacggact	cccagagcca	gtgagtgggt
	1441	ggggctggaa	catgagttca	tctatttcct	gccacatct	ggtataaaaag	gaggcagtgg
40	1501	cccacagagg	agcacagctg	tgtttggtg	cagggccaag	agcgtgtgca	agaagaccca
	1561	cacgcccccc	tccagcagct	gaattcctgc	agctcagcag	ccgccgccag	agcaggacga
	1621	acgcgcaatc	gcaaggcacc	tctgagaact	tcaggtagga	gaaaagcaaa	ctccctccaa
	1681	cctcttactt	cggtcttaag	gcagagaact	cgcctcccca	gaatctcctc	cctccatgat
45	1741	ccccgcctat	tcctctatit	tcttttcctc	ggacctgcag	ccttgggtcg	accctgccct
	1801	aggggtgact	gcaggagagc	agggaggatg	gtcaggcgctc	accaacaacc	ccatcaccca
	1861	gtaacaagaa	ccttgactct	ctcagtcctt	ctgcatcaag	acacttaccc	atttcccacc
	1921	tcatgcctgc	taacttgaat	gaaacaatcg	ctgggaaagc	attaagagaa	ttaaggctgg
50	1981	gcactgtggc	tcatgcctgt	aatcccagca	ctttgtgagg	ctgaggcagg	cagataactt
	2041	gagcccagga	gtttgagacc	agcctgggca	acatggcaaa	accctgctct	ccccaaaaaa
	2101	tacaaaaatt	agctgggcgt	gctgggtgtgc	ctgtattccc	agctacttgg	gaggctgagg
55	2161	tgggaggatt	gcttcagctg	gggaggcgga	ggctgcaggg	agccaagact	gagccattgc

60

65

ES 2 346 881 T3

2221	accagcctg	ggtgacagag	caagaccctg	tctctaaaaa	tgaatgaaag	gaaggaagaa
2281	agagagagaa	agagagagag	gaaagaagga	aggaagtaaa	gaagaaagaa	agaaagaaag
2341	aggaagaggg	aagaaagaaa	gaaaagaaag	aaaagaaaag	aaagcaaatt	taaagcttat
5 2401	gcaaatcaaa	gatgttgtga	taattgataa	ttgagtctgg	gctaaattcc	ccctgggctg
2461	caaaggcaga	gagtggtaat	gacttctcac	ctgcttttct	tctaaggctt	ttttacggga
2521	cacagagggg	agggagatgg	actggattcc	aagattccca	cagggaaga	tgggcgaaga
10 2581	ctccctgcc	ctgcccggg	ataagtcagt	ctgagtgaga	cggagtggg	tgggcttaga
2641	acctaagcat	gtcatgtgt	cttccctgc	cttgccctag	tgttcaacta	ccacctgctt
2701	gcaggaaaca	agaagagcag	ggcccacagc	tggccagctc	ccctcccctc	ccgctgtct
2761	tccagaacga	ttccttcacc	agccctcttt	ccattgctct	aggatgcaga	tgtctccagc
15 2821	cctcacctgc	ctagtccctg	gcctggccct	tgtcttttgt	gaagggtctg	ctgtgcacca
2881	tcccccatcc	tacgtggccc	acctggcctc	agacttcggg	gtgaggggtg	ttcagcaggt
2941	ggcgagggc	tccaaggacc	gcaacgtgg	tttctcacc	tatgggtg	cctcggtgtt
20 3001	ggccatgctc	cagctgacaa	caggaggaga	aaccagcag	cagattcaag	cagctatggg
3061	attcaagatt	gatggtgagc	cacgggacac	caggggaggt	gggtggcatg	cagaacagac
3121	ctaccagaag	ccaaggaag	gctggctctg	gcttagccga	gccaagcccc	atacagctgt
3181	gctgcagggg	ccaccccatc	ttcttccac	tacactccaa	gtcaactggc	ccttgaatct
25 3241	ccaaggtgt	ctgaccagta	gatttacgc	ttattacca	ccgtgtgatc	ttaacctcgt
3301	taagtttgcc	catctacaaa	atgaggatta	tttgtgtcc	taaagaattc	atgagccggg
3361	cgcggtggct	caaacgcctg	taatccagc	actttgggag	gccaaggcgg	gcggatcatg
3421	aggtcaggag	atcaagacca	tcctggctaa	cacagtgaag	ctccatctct	actaaaaata
30 3481	caaaaaaat	tagccaggcg	tgggtggcag	cgctgtagt	cccagctact	cggtgggctg
3541	aggcaggaga	atggcatgaa	cccaggaggc	agagcttgca	gtgagctgag	atcgtgccac
3601	tgcactccag	cctggggcag	agagagagac	tccgtctcaa	aaaaaaaaat	taaaagaatt
35 3661	catggaatta	cacttgtgaa	atacttagca	tagccatcac	tataggaaaa	aaatctaagg
3721	ccaggcacag	tgcctcatgc	ctgtaatctc	agcactttcg	gagtttgagg	oaggaggatc
3781	acccaaggct	aggagttcaa	ggccagcctg	ggcaatacgg	tgaacccccg	tctctaataa
3841	aaatataaaa	attagtctga	tgaggtgggt	cacctgtaat	cccagctact	caggaagctg
40 3901	agacacaaga	atcactttta	cccgggaggt	ggaggtggca	gtgagctgag	atcacaccat
3961	tgcactccag	cctgggtgac	agagtgcagc	ctgtcaaaaa	aaagaaaaga	aagagagaga
4021	gagagagaag	agagagaaag	aaagaagaag	aaagaaagaa	agagagagag	agaaagaaag
45 4081	aaagaaacaa	agaaacaaag	aaagaagga	aaagaaaaaa	aaaactaagg	ccaggcaagg
4141	tggcttatga	ctgtaatttc	agcactttgg	aagattgagg	caggaggatc	acttgaggcc
4201	agaagttcga	gacaagactg	agcaacaggg	agacccctgc	ctctacaaaa	aaatttacia
4261	attagccaga	tgtggtgaca	catacctgta	gtcccaacta	ctcaggaggc	tgaggtggga
50 4321	ggatggcttg	agcccaggag	ctggaggctg	cagtgcagta	tgattgtacc	actgcacttc
4381	agcctgggca	acaaagggaa	gccctgtctg	aaaaaaaaaa	aaaaagaaaa	agaagaagaa
4441	agaaaatatt	tagggttcat	ccaggaggca	gaggttgag	taagctgaca	tcgcgccatt
4501	gcactccagc	ctgggagaca	agagcaaaac	tccaactcaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa
55 4561	caggaagaaa	atatttaggg	ttcataactt	aagaacagag	aaaaatattc	tagcccaaag

60

65

ES 2 346 881 T3

4621 aaaggggttg gatctgagac ttttgaagaa aggaaggaga tacagaaaag agatttcac
 4681 ctggaatgaa atctccctcc agagagccct gggaaagcac ggtagcccc atccatcaga
 5 4741 gtggagcccc ttgtggggga agtgggctcg gctgggaacc ctcaattcag cataagcctc
 4801 acatgtcctc tcctctctgt cccggtgcag acaagggcat ggccccgcc ctccggcatc
 4861 tgtacaagga gctcatgggg ccatggaaca aggatgagat cagcaccaca gacgcgatct
 4921 tcgtccagcg ggatctgaag ctggtccagg gcttcatgcc ccacttcttc aggtgttcc
 10 4981 ggagcacggt caagcaagtg gacttttcag aggtggagag agccagattc atcatcaatg
 5041 actgggtgaa gacacacaca aaaggtgagc aggcagggaa aggaaacca tttcctgggc
 5101 ctcaagagaa agggaatttg gaaataaatc cacatatccc agttgggtgc agtagttcac
 5161 acctgtaatc ccagcccaac actttgggag gtctaggcga gaggaaggct tgaggcctgg
 15 5221 agtttgagac cagcctggcc aacataacaa gacctcatct cttcaaaaaa tttaaaaacc
 5281 agccgggcat ggtggtgcac acctgtagtc ccagctactt gggaggctga ggtgggagga
 5341 tcacttgagt ccagcagttc aaggctgcag tgagctatgt ttgcaccacc aactccagc
 20 5401 ctgagtcaca gaacaagacc tcactctctaa aaaacaaaca aaaaccaaat ccacatatcc
 5461 taaaaaatgc tccttttcag cattctcttc tctatggaca aagggtgga tgctttaaga
 5521 accaaatctt aggtgggca cgggtggtca cgcctctaat cctagcactt tgagaggcca
 5581 aggcgggagc attgcctgag cacaggagt cagagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc
 25 5641 ctgtctctgt caaaaataca aaaaattagc caggtgtgtt ggcgctgccc tataatccca
 5701 gctgctcggg aggatgaggt tcaaagaatc acttgaacct gggaggcaga ggctgcagtg
 5761 agctgagatc atgccactgc actccagcct gggtgacaga gcaagacttt gtctccaaaa
 30 5821 aaaggaaacta gacgggttca tttaaacccc tgactgcagc cctttgacat acatccaatt
 5881 gaggactggg gactccggga aacatctaaa aggcctaaaa actttgtcta acttcagccg
 5941 ggcattggtg ctcacacctg taatcccagc actttgggag gctgaggcag gtggatcaca
 6001 aggtcaggag tttgagacga gcctgaccaa catggtgaaa ccccgctctc actaaaaata
 35 6061 caaaaattag ccaggcatgg tggcaggcgc ctgtaatccc agctattcgg gaggtgagg
 6121 caggagaatt gcttgaacct cggagacaga ggttgacagc agccgagatc gcgccactgc
 6181 actccagcct ggcaatagag tgagactcca tctcaaaaca acaacaacaa caacaacaac
 40 6241 aacaaaatcg tctaacttcc tgatcttccct gatcattgat tttcccatag gtatgatcag
 6301 caacttgctt gggaaaggag ccgtggacca gctgacacgg ctggtgctgg tgaatgccct
 6361 ctacttcaac ggccagtgga agactccctt ccccgactcc agcaccacc gccgcctctt
 6421 ccacaaatca gacggcagca ctgtctctgt gccatgatg gctcagacca acaagttcaa
 45 6481 ctatagtaag tccaagagcc cttcccccac agcccacagc aactgcatct cattcctggg
 6541 gtctcccaag gaatacccaa aatgtcaccc tctgagggag gaagaccaca gggaatgctc
 6601 ccccttaagg gaggagagac cctagaatat actccagctt tgacaaagat ttoccaaagca
 50 6661 ggagacatca ggataatggg aacagaagac aggaggttta tcccatgaag gatgaagaag
 6721 ctgaaatcca gagattccct cagggccaca tttgtccacc tgactccagg gtctcatctt
 6781 cgtgtgttgc tagtgtgatt acctggggat gagaaatcct gctgggggag ttgagggtta
 6841 gaggatgagg actccaggtg ctgtggctca cgcctgtaat cccagcactt tgggaggcca
 55 6901 aggcagggtg atcaggagtt tgaggtcagg agtttgagac cagcctggcc aacatggtga
 6961 aacctgtct ctactaaaaa tgcaaaaatt agccagggtg ggtggcaggc gcctgtaatc

60

65

ES 2 346 881 T3

'7021 ccagctactc gggaggctga ggcaggagaa tcacttgagc ccgggagggtg gaggttgacag
 7081 tgagccgaac gaaattgagc cacttcaccc cagcctgggc aaaagagtga aattccattc
 7141 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaggatgagg actgggatga actggtggct ggggtgtggg
 5 7201 aaaatggaag tgaaggaagg ccaaaagaga cagagaaggc ctggcgccgc gactcacgcc
 7261 tataatccca gcactttggg aggctgagaa gggggattgc ttgaggccag aagttgaata
 7321 ccagtctggg cagcatagca agaccctgcc tctacaaaaa aaaaattttt ttttaattagc
 10 7381 caggcttggt gaqatgcatc tgtagtctac tcaagaagct gaggtgaggc caggcagggt
 7441 ggctcacgcc tgtattccca gcactttggg aggtcaaggc ggggtgatga cctgaggtca
 7501 ggagttcaag accagcctgg ccaacatggt gaaaccccat ctgtataaaa atacaaaaat
 7561 tagctgggca tgatagcagg tgcctgtaat tccagctact caggaggctg aggtgggaga
 15 7621 atctattgaa cccgggaggg ggaggttgca gtgagccgag atcatgccat tgcactccag
 7681 cctgggcgac agagtgaac tcttctcaa aacaaacaaa caaacaaaaa aacaaaatac
 7741 agaagctgag gcgggaggaa catttgaacc ggattoggag gctgcagtga gctatgattg
 20 7801 caccactgag ctccagctg tgtgacagt agaccctgtc tcttacacac acacacacac
 7861 acacacacac acatgcacac acacagagag agagaaatta gaagatactg aattggcaga
 7921 agagaa'ggga aatagaaatt aaaatactga ataggggagc agtgaacagg ggatacccaa
 7981 aagccaagag cgagagagag cctggcttcc agaaatagtg gagaagccag gagaactagg
 25 8041 tgaaaaccca gtgctgggtt gccatcagcg agagctggag ccatttccaa cgaacctatc
 8101 tgtcgtcttc acagctgagt taccacgcc cgatggccat tactacgaca tcttggaaact
 8161 gccctaccac ggggacaccc tcagcatgtt cattgctgcc cttatgaaa aagaggtgcc
 30 8221 tctctctgcc ctacccaaca ttctgagtgc ccagctcatc agccactgga aaggcaacat
 8281 gaccaggctg ccccgctcc tggttctgcc caagtaagcc acccgctat cccccgacc
 8341 taccaacccc tctctcctgg ctccctaaag tcaccgcccc caggttgaat tcccagatc
 8401 tgtga'gctt gcaggacatg catgtgtggg aggtgatgg gaaactgtg cctgggtttg
 35 8461 attatgagtc ttgcaatcat ccctccccc gtttctgctg gagggcaggg gacagctctt
 8521 cctgaccaca cccacacatt gactatcccc agaataccca gcaaaagccc ccaaaaggag
 8581 agtcagagaa atgaggaggg tgggggcccc atcagtcac atctacttag ggtcgcccca
 40 8641 tcagcacttc catcccaac ctttcaagt caacatccaa acaaaagaaa tcacttccaa
 8701 ggacggagca gctcaaagcg cagcttctag ctggggttcc aagaaagcag atttttcgaa
 8761 atccttctgc agaaggaagc aaagagattt tttgaaatct ttctgcagaa ggagaaggct
 8821 ggagctgggg aactccagaa ttataggga gcctcccacc acgctcatcc caaatttccg
 45 8881 gatgctataa tgccaggctt ggggaaagag gagaatttag ttggttagct ggtgcgtgct
 8941 ctacttgca tctctctct tctcttttt tttttttct ctctctctct ggctcataaa
 9001 aatggaggta attagtgtg ccctggtgag aagcagagag tgcacaaagg cccctgctt
 50 9061 gagtcctctt cagggttagc tctcagaaac acaatctgca gaacagattt ttgttccaac
 9121 atccttgagc gagaatttgc cttagcttc cccacccca gccaggtga ataaaattat
 9181 gctgaaacta ctgtcttatt tgaggaaagt aattagtcat aggtgggagg ggtggggag
 9241 attgcagaag aatgttcatg aatattagga ttttcagctc taagggggga ctttgtaaac
 55 9301 agcttttaga gaagaaccag gccggctggg tgtggtggct catgcctgta atctcagcat
 9361 ttggggaggc caaggcgggc ggatcacttg aggtcaggag tttgagacca gcctggccaa

60

65

ES 2 346 881 T3

9421 catggtgaaa cctgtctctt attaaaaata caaaaattag ccagcctgtg tagcgagcgc
 9481 ctatgatccc agctactccg gaggctgagg ccagagaatc acatgaacct gggaggtgga
 5 9541 ggctgcagtg agccgagatc acgccactgc actccagcct gggggacaga gcaagaatct
 9601 gtttcaaaaa aaaaaaaga aaaataggaa ggaaggaagg aaaggaaagg aaagaagaga
 9661 gagagaaaga aagagagaga gagagagaga aagaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa
 9721 gaaagaaaga aagaaagaaa gaaaaagaaa ggaagaaag aacgaacgaa ccaggcctcc
 10 9781 ctctccaacc ttacacctcg tccctattct ggccacttga ttccggggac acctggtagg
 9841 ggatggggaa aggtgggagc tggcagccag aggggacccc ggtttgagca gcctcttgct
 9901 gctatctgca ggttctccct ggagactgaa gtcgacctca ggaagcccct agagaacctg
 9961 ggaatgaccg acatgttcag acagtttcag gctgacttca cgagtctttc aggttaagaag
 15 10021 actttccttt gcattttctc accccagtgg actgcggggg cccctaagag gaaaaaggaa
 10081 cctctccttg agagcggcag ctgatctaact cctgtatcca catctgtttc agaccaagag
 10141 cctctccacg tcgcgcaggc gctgcagaaa gtgaagatcg aggtgaacga gagtggcacg
 20 10201 gtggcctcct catccacagg tgagtctggc tcaggtgagg ctccacgggt gtgcctcca
 10261 tcgcccttca ggataactgg tcccagacc cggaaaggac cccgcagccc tctcggcaca
 10321 gagcagctct gtctgtgctc agccatcacc cactccccac ctgtttctca gcctggaaaa
 10381 cgggcttggg accatggaac cctgtttcct cgcctgatgg ctccctaagt ccctgactgt
 25 10441 gaaaaggcct cctaagaaa aacccaagtt gttcccacag tgggaagtaa acttaagaaa
 10501 catgcttata aggtgggca tgggtggctcc cacctgtaat cccagcgctt tgggggacca
 10561 aggcaggtgg atcacttgag gtcaggaatt cgagaccagc ctgggcaaca tggcaaaacc
 30 10621 ctatctctac taaaaataca aaaattaggc aggcgtggtg gcatgtgcct gtagtcccag
 10681 ctacttgga ggctgaggca ggagaatcac ttgaatccag gaggcagagg ttgcagtgag
 10741 ccgagatcac gctgctgcac tccagcctgg gcaatagagc atgactctga agaaaagaaa
 10801 gaaagaaaga gagagagaga gaaaagaaag aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaagaa
 35 10861 agaaagaaag aaagaaagaa agagaaagaa agagaagaaa agaaaagaaa gagcttatca
 10921 ataagccctt aaaggattta gataaatgtg tgtaagggaa gagctgatcc attgctacca
 10981 agctcctgga ggaaccagg tctcagagga tgtccctaaa cttttaaggt tcatattcag
 40 11041 gaaaacaaac aacttccagc tgggcttagt ggctcacacc tgtaatccca gcactttggg
 11101 aggccgaggc aggaggatcg cttgagccca ggaatttgag accagcctgg gcaatataat
 11161 gagactgtgc tctacaaaaa ttagaaaaaa attagccagg catggtggca tgcacctgta
 11221 gcccagtta cttgggagac tgaggtggga ggatcacttg agcccatgag ttcaaggctg
 45 11281 cagttagcca tgaaggtgcc actgcactcc cgcctgggag acagagggag accctgtctc
 11341 taagaaaaac ggcgggggtg ggggtggtgc cagtgccagc atccctctgt tctaagacat
 11401 tgtcccttct cttgcagctg tcatagtctc agcccgcatg gccccgagg agatcatcat
 50 11461 ggacagaccc ttctctttt tggtccggca caaccccaca ggtgagcctg gaacccatca
 11521 cgttccacat cctcccaccc attctttctc tcaggaacta gtcccagacag atgcagacat
 11581 ccctctatcc ctgagagggc tctgggcagg gaaccataac cctaccctgc ttctgtccc
 11641 aagaggaggc taccttctat caccacaga cagtgccggg tcccgcctct gtgactcagg
 55 11701 cagctgcgac tccagacago tcactcatct gcctagatct cagtccttcc acccacatcc
 11761 agcctgatga gctgtccac tcttctgtct tctcaacccc catggttctt ccaccctcag

60

65

ES 2 346 881 T3

11821 gaacagtcct tttcatgggc caagtgatgg aacctgacc ctggggaaaag acgccttcat
 11881 ctgggacaaa actggagatg catcgggaaa gaagaaactc cgaagaaaag aatttttagtg
 11941 ttaatgactc tttctgaagg aagagaagac atttgccttt tgttaaaaga tggtaaacca
 5 12001 gatctgtctc caagaccttg gcctctcctt ggaggacctt taggtcaaac tccctagtct
 12061 ccacctgaga ccctgggaga gaagtttgaa gcacaactcc ctttaaggtct ccaaaccaga
 12121 cgggtgacgcc tgcgggacca tctggggcac ctgcttcac cctctctctt gccactcgg
 10 12181 gtctgcagac ctgggttcca ctgaggcctt ttgcaggatg gaactacggg gcttacagga
 12241 gcttttgtgt gcctggtaga aactatttct gttccagtca cattgccatc actcttgtag
 12301 tgcttgcac cgcggaggag gctggtgaca ggccaaaggc cagtggaga aacaccttt
 12361 catctcagag tccactgtgg cactggccac ccctcccag tacaggggtg ctgcagggtg
 15 12421 cagagtgaat gtccccatc atgtggcca actctccttg cctggccatc tccctccca
 12481 gaaacagtgt gcatgggtta ttttgagtg taggtgactt gtttactcat tgaagcagat
 12541 ttctgttcc ttttattttt ataggaatag aggaagaaat gtcagatgog tgcacagctc
 20 12601 ttcaccccc aatctcttg tggggagggg tgtacctaaa ttttatcat atccttgccc
 12661 ttgagtgtt gttagagaga aagagaacta ctaaggaaaa taatattatt taaactcgct
 12721 cctagtgtt ttttgtgtc tgtgtcacog tatctcagga agtccagcca cttgactggc
 12781 acacacccct ccggacatcc agcgtgacgg agcccacact gccacctgt ggccgctga
 25 12841 gacctcggc ccccccgcgc ccccgcgcc cctcttttcc ccttgatgg aaattgacca
 12901 tacaatttca tctccttca ggggatcaaa aggacggagt ggggggacag agactcagat
 12961 gaggacagag tggtttcaa tgtgttcaat agatttagga gcagaaatgc aaggggctgc
 30 13021 atgacctacc aggacagaac tttcccaat tacaggggtga ctacagccg cattgggtgac
 13081 tcaactcaat gtgtcatttc cggctgctgt gtgtgagcag tggacacgtg aggggggggg
 13141 tgggtgagag agacaggcag ctcggttca actaccttag ataattttc tgaataacct
 13201 ccagccagag ggtagggcac aaagatggat gtaatgact tgggaggcc aaggcgggag
 35 13261 gattgcttga gccaggagt tcaagaccag cctgggcaac ataccaagac ccccgctct
 13321 ttaaaaatat atatatttta aatatactta aatataatt tctaatact ttaaatatat
 13381 atatatattt taaagaccaa tttatgggag aattgcacac agatgtgaaa tgaatgtaat
 40 13441 ctaatagaag cctaatacgc ccaccatgtt ctccactgaa aaatcctctt tctttggggt
 13501 ttttctttct ttcttttttg attttgact ggacgggtgac gtcagccatg tacaggatcc
 13561 acaggggtg tgtcaaatgc tattgaaatt gtgtgaatt gtatgctttt tcaacttttga
 13621 taaataaaca tgtaaaaatg tttcaaaaaa ataataaat aaataaatac gaagaatatg
 45 13681 tcaggacagt cactgccttc acctctcca tttcacaccg gtggtacaag aaatcagaag
 13741 cctaggccag gtgtggtggt tcatgcctgt aatcccagca ctttgggaag ccgagggtgg
 13801 tggatcacct aaggtcagga gtttgagacc agcctggaca acatggtgaa acccgtctc
 13861 tactaaaaat acaaaaatta gccgggctg gtggctggcg cctgtaatcc cagctactcg
 50 13921 ggaggctgag gcaggagaat cacttgaagc caggaggcag aggttgacgt gagctgagat
 13981 tgcaccactg aactccaggc tgggtggcag agcgagactc cctctcaaaa aacaacaact
 14041 acaaaagaaa caacaaaccc agaatacaaa tctgtttggt ccatagacct catgggtgga
 55 14101 agagaccttc ctacatccag gttggcccaa catgggggag tccatgaaat ggtcacctca
 14161 gctctgccac aagcccaag gataagttga ttctgccct gggaatcatc ctcaaaaagg
 14221 aaaaaaatgt tcccctgcca taaactttcc acttatgcag atgggcctgc tcgtaagtca
 60 14281 ctgtcactgt gggttcccaa ctctgttcat gacacttctt tccagacca aatgcttccc
 14341 acccctctac tccactccc cattcttcaa acccagctca agttccagtt cctccacct
 14401 ggacttccca tggatccagc caatatcact ctgaggtccg gcgcagtggc ccacgcctgt
 14461 aatctcagca ctttgggagg ccggggcagg aagattgctt gaggccagga gtttcagacc
 65 14521 agcctggaca acatagttag actc

ES 2 346 881 T3

TABLA 1B

Las secuencias mostradas en la Tabla 1B son fragmentos de secuencias tomados de la secuencia de PAI-1 mostrada en la Tabla 1A anterior. Además, LA SEQ ID NO.: 2 se corresponde con las posiciones 12571-12590 en la Tabla 1A anterior. El nucleótido **t** en la posición 10 en la SEQ ID NO.: 2 se corresponde con el nucleótido encontrado en la posición 12980 de la SEQ ID NO.: 1. En todas las secuencias encontradas en la Tabla 2B a continuación, el polimorfismo representado por la **t en negrita y subrayada** puede estar sustituido por una **g**. En las SEQ ID NOS.: 3-11 en la Tabla 2B, la **t en negrita y subrayada** se corresponde con el nucleótido encontrado en la posición 12580 de la SEQ ID NO.: 1. Debido a la posible variabilidad en la secuencia de PAI-1, los motivos de secuencia a continuación pueden ser útiles en la identificación de secuencias de PAI-1 de un paciente para uso en la determinación de genotipo. Por ejemplo, las secuencias de pacientes que forman alineamientos con los siguientes motivos (la SEQ ID NO.: 3-11) pueden indicar que la secuencia del paciente es una secuencia de PAI-1 y que el nucleótido encontrado en la posición ocupada por la **t en negrita y subrayada** se corresponde con el polimorfismo en la posición 12580 de la SEQ ID NO.: 1 y, por tanto, es adecuado para la determinación de genotipo. Una estrategia similar puede aplicarse a los otros sitios de polimorfismo identificados en este documento.

SEQ ID. NO.	SECUENCIA
SEQ ID. NO. 2	aggaagaaa t gtcagatgcg
SEQ ID. NO. 3	aggaatagag gaagaaa tgt
SEQ ID. NO. 4	tgtcagatgc gtgccagct
SEQ ID. NO. 5	aggaagaaa t gtcagatgcg tgcccagctc
SEQ ID. NO. 6	ataggaatag aggaagaaa t
SEQ ID. NO. 7	ttttatTTTT ataggaatag aggaagaaa t
SEQ ID. NO. 8	ttctgcttcc ttttatTTTT ataggaatag aggaagaaa t
SEQ ID. NO. 9	ttctgcttcc ttttatTTTT ataggaatag aggaagaaa t gtcagatgcg tgcccagctc
SEQ ID. NO. 10	gaagaaa tgt cagatg
SEQ ID. NO. 11	aagaaa tgtc ag

Un “alelo” se define como una cualquiera o más formas alternativas de un gen dado. En una célula u organismo diploide, los miembros de un par alélico (es decir, los dos alelos de un gen dado) ocupan posiciones correspondientes (loci) en un par de cromosomas homólogos y si estos alelos son genéticamente idénticos se dice que la célula u organismo es “homocigótica”, pero si son genéticamente diferentes se dice que la célula u organismo es “heterocigótica” con respecto al gen particular.

Un “gen” es una secuencia ordenada de nucleótidos localizados en una posición particular en un cromosoma particular que codifica un producto funcional específico y puede incluir secuencias sin traducir y sin transcribir en la proximidad de las regiones codificantes. Tales secuencias no codificantes pueden contener secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y la traducción de la secuencia o intrones, etc.

Un “genotipo” se define como la constitución genética de un organismo, normalmente con respecto a un gen o unos pocos genes o una región de un gen relevante para un contexto particular (es decir, los loci genéticos responsables de un fenotipo particular).

Un “fenotipo” se define como los caracteres observables de un organismo.

Un “polimorfismo de un único nucleótido” (SNP) se produce en un sitio polimórfico ocupado por un único nucleótido, que es el sitio de variación entre secuencias alélicas. El sitio está normalmente precedido de y seguido de secuencias sumamente conservadas del alelo (por ejemplo, secuencias que varían en menos de 1/100 ó 1/1000 miembros de las poblaciones). Un polimorfismo de un único nucleótido normalmente se produce debido a la sustitución de un nucleótido por otro en el sitio polimórfico. Una “transición” es la sustitución de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina. Una “transversión” es la sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa. Los polimorfismos de un único nucleótido también pueden producirse a partir de una delección (representada por “-” o “del”) de un nucleótido o una inserción (representada por “+” o “ins”) de un nucleótido con respecto a un alelo de referencia. Además, un experto en la materia debería apreciar que una inserción o delección dentro de una secuencia dada podría alterar la posición relativa y, por tanto, el número de posición de otro polimorfismo dentro de la secuencia.

Un “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” o (SRIS) se define de forma que incluye respuesta inflamatoria sistémica tanto séptica (es decir, sepsis o choque séptico) como no séptica (es decir, posoperatoria). “SRIS” se define adicionalmente según las pautas del ACCP (Colegio americano de médicos torácicos) como la presencia de dos o más de A) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$, B) frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto, C) frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto y D) número de glóbulos blancos > 12.000 por mm^3 o < 4.000 mm^3 . En la siguiente descripción, la presencia de dos, tres, o cuatro de los criterios de “SRIS” se puntuaron cada día durante el periodo de observación de 28 días.

“Sepsis” se define como la presencia de al menos dos criterios de “SRIS” y fuente de infección conocida o presunta.

Choque séptico se definió como sepsis más una nueva insuficiencia orgánica por los criterios de Bruselas más la necesidad de medicación vasotensora.

Resultado o pronóstico del paciente como se usa en este documento se refiere a la capacidad de un paciente para recuperarse de una afección inflamatoria. Una afección inflamatoria puede seleccionarse del grupo constituido por: sepsis, septicemia, neumonía, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome disneico agudo (SDA), lesión pulmonar aguda, infección, pancreatitis, bacteriemia, peritonitis, absceso abdominal, inflamación debida a traumatismo, inflamación debida a cirugía, enfermedad inflamatoria crónica, isquemia, lesión por isquemia-reperfusión de un órgano o tejido, lesión de tejido debida a una enfermedad, lesión de tejido debida a quimioterapia o radioterapia y reacciones a sustancias ingeridas, inhaladas, infundidas, inyectadas o administradas, glomerulonefritis, infección intestinal, infecciones oportunistas y para pacientes que se someten a cirugía mayor o diálisis, pacientes que son inmunodeprimidos, pacientes con agentes inmunosupresores, pacientes con VIH/SIDA, pacientes con presunta endocarditis, pacientes con fiebre, pacientes con fiebre de origen desconocido, pacientes con fibrosis quística, pacientes con diabetes mellitus, pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes con bronquiectasia, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfisema o asma, pacientes con neutropenia febril, pacientes con meningitis, pacientes con artritis séptica, pacientes con infección de las vías urinarias, pacientes con fascitis necrosante, pacientes con otra presunta infección por estreptococos del grupo A, pacientes que han tenido una esplenectomía, pacientes con infección recurrente o presunta por enterococos, otras afecciones médicas y quirúrgicas asociadas al aumento de riesgo de infección, sepsis por grampositivos, sepsis por gramnegativos, sepsis con cultivo negativo, sepsis fúngica, meningococcemia, síndrome pos-bomba, síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, hepatitis, epiglotitis, E. coli 0157:H7, malaria, gangrena gaseosa, síndrome de choque tóxico, tuberculosis micobacteriana, neumonía por *Pneumocystis*, neumonía, leishmaniosis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, fiebre hemorrágica del dengue, enfermedad inflamatoria pélvica, legionela, enfermedad de Lyme, gripe A, virus de Epstein-Barr, encefalitis, enfermedades inflamatorias y autoinmunidad incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, vasculitis sistémica, granulomatosis de Wegener, trasplantes que incluyen corazón, hígado, pulmón, riñón, médula ósea, enfermedad de injerto frente a huésped, rechazo de trasplante, anemia de células falciformes, síndrome nefrótico, toxicidad de agentes tales como OKT3, terapia con citocinas, y cirrosis.

La evaluación del resultado o pronóstico del paciente puede llevarse a cabo por diversos métodos. Por ejemplo, una puntuación “APACHE II” se define como evaluación de fisiología aguda y de salud crónica “Acute Physiology And Chronic Health Evaluation” y en este documento se calculó diariamente a partir de variables clínicas y de laboratorio sin procesar. (VINCENT y col. *Scoring systems for assessing organ dysfunction and survival*. Critical Care Clinics. 16:353-366, 2000) resumen la puntuación APACHE, del siguiente modo “Desarrollada por primera vez en 1981 por KNAUS WA y col. (*Chest* (1991) 100(6):1619-36), la puntuación APACHE se ha convertido en el modelo de predicción de supervivencia más comúnmente usado en las UCI mundialmente. La puntuación APACHE II, una versión revisada y simplificada del prototipo original, usa una puntuación por puntos basada en valores iniciales de 12 medidas fisiológicas rutinarias, edad y estado de salud previo para proporcionar una medida general de la gravedad de la enfermedad. Los valores registrados son los peores valores tomados durante las primeras 24 horas del paciente en la UCI. La puntuación se aplica a uno de los 34 diagnósticos de ingreso para estimar una probabilidad específica de enfermedad de mortalidad (APACHE II predijo el riesgo de muerte). La máxima puntuación APACHE II posible es 71, y puntuaciones mayores se han correlacionado bien con mortalidad. La puntuación APACHE II se ha usado ampliamente para estratificar y comparar diversos grupos de pacientes críticamente enfermos, incluyendo pacientes con sepsis, por gravedad de enfermedad al entrar en ensayos clínicos”.

Una “puntuación de Bruselas” es un método para evaluar la disfunción de órganos con respecto a un nivel inicial. Si la puntuación de Bruselas es 0 (es decir, moderada, grave o extrema), entonces la insuficiencia orgánica se registró como presente en ese día particular (véase la TABLA 1C más adelante). En la siguiente descripción, para corregir muertes durante el periodo de observación se calcularon los días vivo y libre (DAF) de insuficiencia orgánica como se describe previamente. Por ejemplo, la lesión pulmonar aguda se calculó del siguiente modo. La lesión pulmonar aguda se define como presente cuando un paciente cumple estos cuatro criterios. 1) Necesidad de ventilación mecánica, 2) infiltrados pulmonares bilaterales en el pecho compatibles por rayos X con lesión pulmonar aguda, 3) la relación $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ es inferior a 300, 4) no hay pruebas clínicas de insuficiencia cardíaca congestiva o, si un catéter de arteria pulmonar está *in situ* para fines clínicos, una presión de enclavamiento capilar pulmonar inferior a 18 mm de Hg (1). La gravedad de la lesión pulmonar aguda se evalúa midiendo días vivo y libre de lesión pulmonar aguda durante un periodo de observación de 28 días. La lesión pulmonar aguda se registra como presente en cada día que la persona tenga disfunción moderada, grave o extrema como se define en la puntuación de Bruselas. Los días vivo y libre de lesión pulmonar aguda se calculan como el número de días después de la aparición de lesión pulmonar aguda que un

paciente está vivo y libre de lesión pulmonar aguda durante un periodo de observación definido (28 días). Por tanto, una menor puntuación de días vivo y libre de lesión pulmonar aguda indica lesión pulmonar aguda más grave. La razón por la que los días vivo y libre de lesión pulmonar aguda son preferibles para simplificar la presencia o ausencia de lesión pulmonar aguda es que la lesión pulmonar aguda tiene una alta mortalidad aguda y la muerte prematura (dentro de 28 días) excluye el cálculo de la presencia o ausencia de lesión pulmonar aguda en pacientes muertos. La disfunción cardiovascular, renal, neurológica, hepática y de la coagulación se definieron similarmente como presentes en cada día que la persona tenía disfunción moderada, grave o extrema como se define por la puntuación de Bruselas. Los días vivo y libre de esteroides son los días que una persona está viva y que no está tratándose con corticosteroides exógenos (por ejemplo, hidrocortisona, prednisona, metilprednisolona). Los días vivo y libre de vasotensores son los días que una persona está viva y que no está tratándose con vasotensores intravenosos (por ejemplo, dopamina, norepinefrina, epinefrina, fenilefrina). Los días vivo y libre de una relación normalizada internacional (INR) > 1,5 son los días que una persona está viva y que no tiene una INR > 1,5.

TABLA 1C

Sistema de puntuación de disfunción de órganos de Bruselas

ÓRGANOS	Libre de disfunción de órganos		Disfunción de órganos clínicamente significativa		
	Normal	Leve	Moderada	Grave	Extrema
PUNTUACIÓN DE DAF DE DISFUNCIÓN DE ÓRGANOS	1		0		
<u>Cardiovascular</u> TA sistólica (mm de Hg)	>90	≤90 Sensible a fluido	≤90 Insensible a fluido	≤90 más pH ≤7,3	≤90 más pH ≤7,2
<u>Pulmonar</u> P _a O ₂ /F ₁ O ₂ (mm de Hg)	>400	400-301	300-201 Lesión pulmonar aguda	200-101 SDA	≤100 SDA agudo
<u>Renal</u> Creatinina (mg/dl)	<1,5	1,5-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	≥5,0
<u>Hepático</u> Bilirrubina (mg/dl)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	≥12
<u>Hematológico</u> Plaquetas (×10 ⁵ /mm ³)	>120	120-81	80-51	50-21	≤20

5	Neurológico (puntuación de Glasgow)	15	14-13	12-10	9-6	≤5
10	Round Table Conference on Clinical Trials for the Treatment of Sepsis Bruselas, 12-14 de marzo de 1994.					

El análisis de varianza (ANOVA) es una solución estadística habitual para probar diferencias estadísticamente significativas entre conjuntos de mediciones.

La prueba exacta de Fisher es una solución estadística habitual para probar diferencias estadísticamente significativas entre tasas y proporciones de características medidas en grupos diferentes.

2. Métodos generales

Un aspecto de la invención puede implicar tanto la identificación de pacientes o la selección de pacientes que están en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria como la identificación de pacientes que ya tienen una afección inflamatoria. Por ejemplo, pacientes que han sido sometidos a cirugía mayor o tienen programado o están contemplando cirugía mayor pueden considerarse como que están en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria. Además, puede determinarse que los pacientes tienen una afección inflamatoria usando métodos de diagnóstico y evaluaciones clínicas conocidas en las ciencias médicas. Una afección inflamatoria puede seleccionarse del grupo constituido por: sepsis, septicemia, neumonía, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome disneico agudo (SDA), lesión pulmonar aguda, infección, pancreatitis, bacteriemia, peritonitis, absceso abdominal, inflamación debida a traumatismo, inflamación debida a cirugía, enfermedad inflamatoria crónica, isquemia, lesión por isquemia-reperusión de un órgano o tejido, lesión de tejido debida a una enfermedad, lesión de tejido debida a quimioterapia o radioterapia y reacciones a sustancias ingeridas, inhaladas, infundidas, inyectadas o administradas, glomerulonefritis, infección intestinal, infecciones oportunistas y para pacientes que se someten a cirugía mayor o diálisis, pacientes que son inmunodeprimidos, pacientes con agentes inmunosupresores, pacientes con VIH/SIDA, pacientes con presunta endocarditis, pacientes con fiebre, pacientes con fiebre de origen desconocido, pacientes con fibrosis quística, pacientes con diabetes mellitus, pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes con bronquiectasia, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfisema o asma, pacientes con neutropenia febril, pacientes con meningitis, pacientes con artritis séptica, pacientes con infección de las vías urinarias, pacientes con fascitis necrosante, pacientes con otra presunta infección por estreptococos del grupo A, pacientes que han tenido una esplenectomía, pacientes con infección recurrente o presunta por enterococos, otras afecciones médicas y quirúrgicas asociadas al aumento de riesgo de infección, sepsis por grampositivos, sepsis por gramnegativos, sepsis con cultivo negativo, sepsis fúngica, meningococcemia, síndrome pos-bomba, síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, hepatitis, epiglotitis, E. coli 0157:H7, malaria, gangrena gaseosa, síndrome de choque tóxico, tuberculosis micobacteriana, neumonía por *Pneumocystis*, neumonía, leishmaniosis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, fiebre hemorrágica del dengue, enfermedad inflamatoria pélvica, legionela, enfermedad de Lyme, gripe A, virus de Epstein-Barr, encefalitis, enfermedades inflamatorias y autoinmunidad incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, vasculitis sistémica, granulomatosis de Wegener, trasplantes que incluyen corazón, hígado, pulmón, riñón, médula ósea, enfermedad de injerto frente a huésped, rechazo de trasplante, anemia de células falciformes, síndrome nefrótico, toxicidad de agentes tales como OKT3, terapia con citocinas, y cirrosis.

Una vez se identifica que un paciente está en riesgo de desarrollar o que tiene una afección inflamatoria, puede obtenerse la información de secuencias genéticas del paciente. O alternativamente, la información de secuencias genéticas ya puede haberse obtenido del paciente. Por ejemplo, un paciente ya puede haber proporcionado una muestra biológica para otros fines o incluso ya puede tener determinada su secuencia genética por completo o en parte y guardada para uso futuro. La información de la secuencia genética puede obtenerse en numerosas formas diferentes y puede implicar la recogida de una muestra biológica que contiene material genético. Particularmente, el material genético que contiene la secuencia o secuencias de interés. Se conocen muchos métodos en la técnica para recoger muestras corporales y extraer material genético de esas muestras. El material genético puede extraerse de sangre, tejido y pelo y otras muestras. Hay muchos métodos conocidos para el aislamiento separado de ADN y ARN de material biológico. Normalmente, el ADN puede aislarse de una muestra biológica cuando primero la muestra se lisa y luego el ADN se aísla del lisado según una cualquiera de una variedad de protocolos de múltiples etapas que pueden tener duraciones de tiempo variables. Los métodos de aislamiento de ADN pueden implicar el uso de fenol (SAMBROOK, J. y col., "Molecular Cloning", vol. 2, pág. 9.14-9.23, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y AUSUBEL, FM. y col., "Current Protocols in Molecular Biology", vol. 1, pág. 2.2.1-2.4.5, John Wiley & Sons, Inc. (1994)). Normalmente, una muestra biológica se lisa en una disolución de detergente y el componente de proteína del lisado se digiere con proteinasa durante 12-18 horas. A continuación, el lisado se extrae con fenol para eliminar la mayoría de los compo-

nentes celulares y la fase acuosa restante se procesa adicionalmente para aislar el ADN. En otro método descrito en VAN NESS y col. (patente de EE.UU. n° 5.130.423) se usan derivados de fenol no corrosivos para el aislamiento de ácidos nucleicos. La preparación resultante es una mezcla de ARN y ADN.

Otros métodos para el aislamiento de ADN utilizan agente caotrópicos no corrosivos. Estos métodos, que se basan en el uso de sales de guanidina, urea y yoduro de sodio, implican la lisis de una muestra biológica en una disolución acuosa caotrópica y la posterior precipitación de la fracción de ADN bruta con un alcohol inferior. La purificación final de la fracción de ADN bruta precipitada puede lograrse mediante uno cualquiera de los varios métodos que incluyen cromatografía en columna (ANALECTS, (1994) vol 22, n° 4, Pharmacia Biotech) o exposición del ADN bruto a una proteína que contiene polianiones como se describe en KOLLER (patente de EE.UU. n° 5.128.247).

Todavía otro método de aislamiento de ADN que se describe por BOTWELL DDL (Anal. Biochem. (1987) 162:463-465) implica lisar células en clorhidrato de guanidina 6 M, precipitar el ADN del lisado a pH ácido añadiendo 2,5 volúmenes de etanol y lavar el ADN con etanol.

Se conocen otros numerosos métodos en la técnica para aislar tanto ARN como ADN tales como el descrito por CHOMCZYNSKI (patente de EE.UU. n° 5.945.515), por el cual el material genético puede extraerse eficazmente en tan sólo veinte minutos. EVANS y HUGH (patente de EE.UU. n° 5.989.431) describen métodos para aislar ADN usando un filtro de membrana hueco.

Una vez se ha obtenido del paciente la información de la secuencia genética del paciente, entonces puede analizarse adicionalmente para detectar o determinar la identidad o genotipo de uno o más polimorfismos en el gen PAI-1. Siempre que el material genético obtenido contenga la secuencia de interés. Particularmente, una persona puede estar interesada en determinar el genotipo del promotor de PAI-1 de un paciente de interés, en el que el genotipo incluye un nucleótido correspondiente a la posición 12580 o LA SEQ ID NO.: 1 o posición 8 de LA SEQ ID NO.: 2. La secuencia de interés también puede incluir otros polimorfismos del gen PAI-1 o también puede contener algunas de las secuencias que rodean el polimorfismo de interés. La detección o determinación de una identidad de nucleótido o el genotipo del (de los) polimorfismo(s) de un único nucleótido u otros polimorfismos puede llevarse a cabo por uno cualquiera de un número de métodos o ensayos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

Estrategia de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) - Puede usarse un análisis basado en geles de RFLP para distinguir entre alelos en sitios polimórficos dentro de un gen. Brevemente, un segmento corto de ADN (normalmente varios cientos de pares de bases) se amplifica por PCR. Cuando sea posible se elige una endonucleasa de restricción específica que corta el segmento de ADN corto cuando una variante de alelo está presente, pero no corta el segmento de ADN corto cuando la otra variante de alelo está presente. Después de la incubación del ADN por PCR amplificado con esta endonucleasa de restricción, los productos de reacción se separan entonces usando electroforesis en gel. Por tanto, cuando el gel se examina, la aparición de dos bandas de bajo peso molecular (las moléculas de bajo peso molecular se desplazan más lejos en el gel durante la electroforesis) indica que la muestra de ADN inicial tenía el alelo que podía ser cortado por la endonucleasa de restricción elegida. A diferencia, si sólo se observa una banda de mayor peso molecular (al peso molecular del producto de PCR), entonces la muestra de ADN inicial tenía la variante de alelo que no podía ser cortada por la endonucleasa de restricción elegida. Finalmente, si son visibles tanto la banda de mayor peso molecular como las dos bandas de menor peso molecular, entonces la muestra de ADN inicial contenía ambos alelos y, por tanto, el paciente era heterocigótico para este polimorfismo de un único nucleótido;

Secuenciación - Por ejemplo la técnica de Maxam-Gilbert para la secuenciación (MAXAM AM. y GILBERT W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977) 74(4):560-564) implica la escisión química específica de ADN marcado en los extremos. En esta técnica, cuatro muestras del mismo ADN marcado se someten cada una a una reacción química diferente para efectuar la escisión referencial de la molécula de ADN en uno o dos nucleótidos de una identidad de bases específicas. Las condiciones se ajustan para obtener sólo la escisión parcial, los fragmentos de ADN se generan así en cada muestra cuyas longitudes dependen de la posición dentro de la secuencia de bases de ADN del (de los) nucleótido(s) que están sometidos a tal escisión. Después de realizarse la escisión parcial, cada muestra contiene fragmentos de ADN de diferentes longitudes, cada uno de los cuales con extremos con el mismo o dos de los cuatro nucleótidos. En particular, en una muestra cada fragmento termina con una C, en otra muestra cada fragmento termina con una C o una T, en una tercera muestra cada uno termina con una G, y en una cuarta muestra cada uno termina con una A o una G. Si los productos de estas cuatro reacciones se resuelven por tamaño, por electroforesis sobre un gel de poliacrilamida, la secuencia de ADN puede leerse a partir del patrón de bandas radiactivas. Esta técnica permite la secuenciación de al menos 100 bases desde el punto de marcado. Otro método es el método dideoxi de secuenciación publicado por Sanger y col. (SANGER y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977) 74(12):5463-5467). El método de Sanger se basa en la actividad enzimática de una ADN polimerasa para sintetizar fragmentos dependientes de secuencia de diversas longitudes. Las longitudes de los fragmentos se determinan por la incorporación aleatoria de terminadores específicos de bases de dideoxinucleótidos. Estos fragmentos pueden entonces separarse en un gel como en el método de Maxam-Gilbert, visualizarse y determinar la secuencia. Se han hecho numerosas mejoras para refinar los métodos anteriores y para automatizar los métodos de secuenciación. Similarmente, también se conocen métodos de secuenciación de ARN. Por ejemplo, se ha usado la transcriptasa inversa con dideoxi-nucleótidos para secuenciar ARN del virus de la encefalomiocarditis (ZIMMERN D. y KAESBERG P. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA (1978) 75(9):4257-4261). MILLS DR. y FRAMER FR. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76(5):2232-2235) describen el uso de Q-beta-replicasa y el análogo de nucleótido inosina para la secuenciación ARN en un mecanismo de terminación de cadenas. También se conocen métodos químicos directos para la secuenciación de ARN (PEATTIE DA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76(4):1760-1764). Otros métodos incluyen aquellos de DONIS-KELLER y col. (1977, Nucl. Acids Res. 4:2527-2538), SIMONCSITS A. y col. (Nature (1977) 269(5631):833-836), AXELROD VD. y col. (Nucl. Acids Res. (1978) 5(10):3549-3563) y FRAMER FR. y MILLS DR. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75(11):5334-5338. Las secuencias de ácidos nucleicos también pueden leerse estimulando la fluorescencia natural de un nucleótido escindido con un láser, mientras que el único nucleótido está contenido en una matriz potenciadora de la fluorescencia (patente de EE.UU. nº 5.674.743);

Los métodos de hibridación para la identificación de SNP usando técnicas de hibridación se describen en las patentes de EE.UU. nº 6.270.961 y 6.025.136;

Una incorporación de terminador de colorante dirigida al molde con el método de detección por polarización fluorescente (TDI-FP) se describe por FREEMAN BD. y col. (J Mol Diagnostics (2002) 4(4):209-215) para el cribado a gran escala;

Ensayo de ligadura de oligonucleótidos (OLA) - se basa en la ligadura de oligonucleótidos de sonda y de detector fusionados a una cadena de amplicón de reacción en cadena de la polimerasa con detección por un inmunoensayo enzimático (VILLAHERMOSA ML. J Hum Virol (2001) 4(5):238-48; ROMPPANEN EL. Scand J Clin Lab Invest (2001) 61(2):123-9; IANNONE MA. y col. Cytometry (2000) 39(2):131-40);

La amplificación por ligadura-círculo rodante (L-RCA) también se ha usado satisfactoriamente para genotipar polimorfismos de un único nucleótido como se describe en QI X. y col. Nucleic Acids Res (2001) 29(22):E116;

El ensayo de nucleasa en 5' también se ha usado satisfactoriamente para genotipar polimorfismos de un único nucleótido (AYDIN A. y col. Biotechniques (2001) (4):920-2, 924, 926-8);

Los métodos de corrección de lectura por polimerasa se usan para determinar identidades de SNP como se describe en el documento WO 0181631;

La detección de mutaciones de ADN de un único par de bases por transducción electrónica amplificada por enzima se describe en PATOLSKY F y col. Nat Biotech. (2001) 19(3):253-257; o

Los métodos de PCR específica de alelos también se han usado satisfactoriamente para genotipar polimorfismos de un único nucleótido (HAWKINS JR. y col. Hum Mutat (2002) 19(5):543-553).

Alternativamente, si ya se conocen datos de secuencias del paciente, entonces la obtención puede implicar la recuperación de los datos de secuencias de ácidos nucleicos del paciente de una base de datos, seguido por determinar o detectar la identidad de un ácido nucleico o genotipo en un sitio de polimorfismo leyendo la secuencia de ácidos nucleicos del paciente en el sitio polimórfico.

Una vez se determina o se detecta la identidad de un polimorfismo(s) puede obtenerse una indicación en cuanto al resultado o pronóstico del paciente basándose en el genotipo (la identidad del nucleótido en una posición) del polimorfismo de interés. En la presente invención, los polimorfismos en el gen PAI-1 se usan para obtener un pronóstico o para determinar el resultado del paciente o la selección de terapias. Los métodos para obtener un resultado o pronóstico del paciente o para cribar pacientes pueden ser útiles para determinar la capacidad de un paciente para recuperarse de una afección inflamatoria. Alternativamente, los sitios de polimorfismo único o sitios de polimorfismo combinado pueden usarse como una indicación de una capacidad del paciente para recuperarse de una afección inflamatoria, si están ligados a un polimorfismo determinado que va a ser indicativo de una capacidad del paciente para recuperarse de una afección inflamatoria.

Una vez se determina el resultado o pronóstico del paciente, tal información puede ser de interés para médicos y cirujanos para ayudar en la decisión entre posibles opciones de tratamiento, para ayudar a determinar el grado al que se monitorizan los pacientes y la frecuencia con la que se produce tal monitorización. En última instancia, las decisiones de tratamiento pueden hacerse en respuesta a factores tanto específicos al paciente como basados en la experiencia del médico o cirujano responsable del cuidado del paciente. Las opciones de tratamiento que puede considerar un médico o cirujano en el tratamiento de un paciente con una afección inflamatoria pueden incluir, pero no se limitan a, las siguientes:

- (a) uso de terapia antiinflamatoria;
- (b) uso de esteroides;
- (c) uso de proteína C activada (drotrecogina alfa o Xigris™ de Lilly);

- (d) uso de moduladores de la cascada de la coagulación (tales como diversas versiones de heparina) uso de anticuerpo para el factor tisular;
- (e) uso de anti-trombina o anti-trombina III;
- (f) estreptocinasa;
- (g) uso de agentes antiplaquetarios tales como clopidogrel; y
- (h) tensioactivo.

Los tratamientos alternativos actualmente en desarrollo y potencialmente útiles en el tratamiento de una afección inflamatoria pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes: anticuerpos para el factor de necrosis tumoral (TNF) o incluso anticuerpo para endotoxina (es decir, lipopolisacárido, LPS); receptor del factor de necrosis tumoral (TNF); inhibidores de la ruta del factor tisular (tifacoginTM alpha de Chiron); hidrolasa del factor activador de plaquetas (PAFaseTM de ICOS); anticuerpos para IL-6; anticuerpos, antagonistas o inhibidores para la secuencia 1 del grupo de alta movilidad (activador tisular del plasminógeno de HMGB-1 o HMG-1; antagonistas de bradiquinina; anticuerpo para CD-14; interleucina 10; inmunoglobulina G1 del receptor del factor de necrosis tumoral soluble recombinante (Roche); procisteína; inhibidor de elastasa; y antagonista del receptor 1 de interleucina recombinante humana (IL-1 RA).

Alternativamente pueden emplearse métodos similares para identificar nuevos polimorfismos en la secuencia de PAI-1 que guardan relación con el resultado o pronóstico del paciente.

Como se describe anteriormente, la información de la secuencia genética o la información del genotipo pueden obtenerse de un paciente en el que la información de la secuencia contiene uno o más sitios de polimorfismo de un único nucleótido en el gen PAI-1. Por tanto, como se describe previamente, la identidad de secuencias de uno o más polimorfismos de un único nucleótido en el gen PAI-1 de uno o más pacientes puede entonces detectarse o determinarse. Además, el resultado o pronóstico del paciente puede evaluarse como se describe anteriormente, por ejemplo, puede usarse el sistema de puntuación APACHE II o la puntuación de Bruselas para evaluar el resultado o pronóstico del paciente comparando puntuaciones de pacientes antes y después del tratamiento. Una vez se ha evaluado el resultado o pronóstico del paciente, el resultado o pronóstico del paciente puede guardar relación con la identidad de secuencias de un polimorfismo(s) de un único nucleótido. La correlación del resultado o pronóstico del paciente puede incluir adicionalmente análisis estadístico de puntuaciones del resultado del paciente y polimorfismo(s) para varios pacientes.

Fenotipo clínico

La variable de resultado primaria fue la supervivencia al alta hospitalaria. Las variables de resultado secundarias fueron días vivo y libre de insuficiencia del sistema de órganos cardiovascular, respiratorio, renal, hepático, hematológico y neurológico, además de días vivo y libre de SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), aparición de sepsis y aparición de choque séptico. El SRIS se consideró presente cuando los pacientes cumplieron al menos dos de cuatro criterios de SRIS. Los criterios de SRIS fueron 1) fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$) o hipotermia ($<35,5^{\circ}\text{C}$), 2) taquicardia (>100 latidos/min en ausencia de bloqueadores beta, 3) taquipnea (>20 respiraciones/min) o necesidad de ventilación mecánica y 4) leucocitosis (recuento de leucocitos total $> 11.000/\mu\text{l}$) (Anónimo. *Critical Care Medicine* (1992) 20 (6):864-74). Los pacientes se incluyeron en esta cohorte el día natural en el que cumplieron los criterios de SRIS.

Las características demográficas iniciales de un paciente que se registraron incluyeron edad, sexo, tanto diagnóstico médico como quirúrgico para el ingreso (según los códigos de diagnóstico de APACHE III (KNAUS WA y col. *Chest* (1991) 100(6):1619-36)) y la puntuación APACHE II de ingreso. Se registraron los siguientes datos adicionales para cada periodo de 24 horas (8 am a 8 am) durante 28 días para evaluar la disfunción de órganos, SRIS, sepsis, y choque séptico.

La disfunción de órganos clínicamente significativa para cada sistema de órganos se definió como presente durante un periodo de 24 horas si había pruebas de al menos disfunción de órganos moderada usando los criterios de Bruselas (TABLA 1C) (RUSSELL JA y col. *Critical Care Medicine* (2000) 28(10):3405-11). Debido a que los datos no siempre estaban disponibles durante cada periodo de 24 horas para cada variable de disfunción de órganos, los inventores usaron la hipótesis "transferida" como se define previamente (Anónimo. *New England Journal of Medicine* (2000) 342(18):1301-8). Brevemente, durante cualquier periodo de 24 horas en que no hubo medición de una variable, los inventores transfirieron los criterios "presentes" o "ausentes" del periodo de 24 horas previo. Si nunca se midió una variable, se supuso que era normal.

Para evaluar adicionalmente la función cardiovascular, respiratoria y renal, los inventores también registraron durante cada periodo de 24 horas la ayuda de vasotensores, ventilación mecánica y la ayuda renal, respectivamente. El uso de vasotensores se definió como dopamina $> 5 \mu\text{g/kg/min}$ o cualquier dosis de norepinefrina, epinefrina, vasopresina o fenilefrina. La ventilación mecánica se definió como la necesidad de entubación y presión positiva de las

vías respiratorias (es decir, la ventilación por pieza en T y por mascarilla no se consideraron ventilación). EL soporte renal se definió como hemodiálisis, diálisis peritoneal o cualquier modo de soporte renal continuo (por ejemplo, hemodiálisis veno-venosa continua).

5 Para evaluar la duración de la disfunción de órganos y para corregir la puntuación de la disfunción de órganos para muertes en el periodo de observación de 28 días, los cálculos se hicieron de días vivo y libre (DAF) de disfunción de órganos como se notificó previamente (BERNARD GR y col. *New England Journal of Medicine* (1997) 336(13):912-8). Brevemente, durante cada periodo de 24 horas para cada variable, DAF se puntuó como 1 si el paciente estaba vivo y libre de disfunción de órganos (disfunción de órganos normal o leve, Tabla 1). DAF se puntuó como 0 si el paciente
10 tuvo disfunción de órganos (moderada, grave o extrema) o no estaba vivo durante el periodo de 24 horas. Cada uno de los 28 días después del ingreso en la UCI se puntuó en cada paciente de este modo. Por tanto, la menor puntuación posible para cada variable fue cero y la mayor puntuación posible fue 28. Una puntuación baja es indicativa de más disfunción de órganos ya que serían menos días vivo y libre de disfunción de órganos.

15 Similarmente se calcularon los días vivo y libre de SRIS (DAF de SRIS). Cada uno de los cuatro criterios de SRIS se registró como presente o ausente durante cada periodo de 24 horas. La presencia de SRIS durante cada periodo de 24 horas se definió por tener al menos 2 de los 4 criterios de SRIS. La sepsis se definió como presente durante un periodo de 24 horas teniendo al menos dos de los cuatro criterios de SRIS y teniendo una infección conocida o presunta durante el periodo de 24 horas (Anónimo. *Critical Care Medicine* (1992) 20(6):864-74). Se excluyeron los
20 cultivos que se juzgaron como positivos debido a contaminación o colonización. El choque séptico se definió como la presencia de sepsis más la presencia de hipotensión (tensión arterial sistólica < 90 mm de Hg o necesidad de agentes vasotensores) durante el mismo periodo de 24 horas.

Haplotipos y selección de htSNP

25 Usando datos genotípicos de caucásicos sin fase (de *pga.mbt.washington.edu* (RIEDER MJ y col. ACCESSION AF386492, vol. 2001: SeattleSNPs. NHLBI Program for Genomic Applications, UW-FHCRC, Seattle, WA (2001)), los haplotipos se dedujeron usando el software PHASE (Figura 1). Entonces se usó MEGA 2 para deducir un árbol filogenético para identificar subtipos de haplotipos primarios (Figura 2). Los haplotipos se clasificaron según el árbol
30 filogenético y la estructura de haplotipos se inspeccionó para elegir SNP de marca de haplotipos (htSNP). Se encontró que 4 htSNP identificaron únicamente los subtipos de haplotipos principales (Figuras 1 y 2). El polimorfismo 4G/5G, que se corresponde con -675 en DAWSON y col. (1993) y la posición 837 de SEQ ID NO: 1 (NCBI ID: rs1799889) y cuatro htSNPs: 11312 (9732) G/A, 12580 (11000) T/G; 12750 (11170) G/A; 13985 (12405) C/T (posiciones entre paréntesis numeradas según el inicio (1581) de la región codificante de la proteína PAI-1 - posiciones sin paréntesis
35 numeradas según la secuencia representada por el número de registro AF386492) se genotiparon entonces en la cohorte del paciente. Finalmente, PHASE se usó para deducir haplotipos de htSNP genotipados en cada paciente en la cohorte críticamente enferma con SRIS.

Genotipado

40 Se extrajo ADN de muestras de sangre periférica usando un kit QIAamp DNA Blood Maxi (Qiagen). El polimorfismo 4G/5G se genotipó usando una estrategia de longitud de fragmentos de restricción. Los htSNP se genotiparon usando la marca Masscode (Qiagen Genomics, Inc) (KOKORIS M y col. *Molecular Diagnosis* (2000) 5(4):329-40). La razón de éxito del genotipado fue >99% para todos los SNP.

3. Ejemplos

Cohorte de pacientes para los Ejemplos 1 y 2

50 Los datos se recogieron para 235 pacientes consecutivos que fueron ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del hospital St. Paul. Esta UCI es una UCI médico-quirúrgica mixta en un hospital universitario afiliado a la universidad de cuidado terciario de la Universidad de Columbia británica. Los resultados se notifican sólo para los pacientes caucásicos (78,6% de todos los ingresos) que se genotiparon satisfactoriamente (n=223) con el fin de disminuir la posible influencia de confusión de mezcla de población secundaria a la diversidad étnica en asociaciones
55 entre genotipo y fenotipo. Estos 235 pacientes representan la cohorte de este estudio.

Ejemplo 1

Deducción del subtipo de haplotipos

60 Se dedujeron los primeros haplotipos del gen PAI-1 (Figura 1), los subtipos de haplotipos principales se identificaron (Figuras 1 y 2) y se seleccionó un conjunto mínimo de htSNP que define los subtipos de haplotipos principales (Figura 1). Los htSNP y el polimorfismo 4G/5G estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 2). Además, se encontró que los haplotipos que contenían el alelo 4G podrían agruparse en el alelo que contenía el alelo T secundario de un polimorfismo C/T en la posición 13985 y el alelo que contenía el alelo G secundario de un polimorfismo T/G en la posición 12580 (Figuras 1 y 2). El mapa de haplotipos en la Figura 1 muestra los haplotipos del gen PAI-1 en caucásicos. Los haplotipos se dedujeron usando PHASE de datos disponibles y se representaron en el estilo de PATIL y col. (Science (2001) 294(5547):1669-70). Las columnas indican loci polimórficos y las filas indican distintos haplotipos

deducidos en individuos caucásicos. Las celdas claras indican alelos raros y las celdas oscuras indican alelos comunes. El mapa se generó a partir de datos de genotipo (disponibles públicamente en <http://pga.mbt.washington.edu/>) de 23 caucásicos sin relacionar del registro Coriell de pacientes. Los haplotipos se dedujeron usando el programa estadístico PHASE 2.0 (STEPHENS M y DONNELLY P Am J Human Genet. (2003) 73(6):1162-1169). Los polimorfismos que proporcionan la misma información que el alelo 12580 G se eligieron basándose en este mapa de haplotipos. Estos polimorfismos proporcionan la misma información que el alelo 12580 G. Un método es identificar positivamente el alelo 12580 G (sección A) bien directamente o en combinación. Otro método es identificar positivamente el alelo 12580T (sección B), bien directamente o en combinación, y así identificar negativamente el alelo 12580 G. Los haplotipos dentro de cada subtipo son muy similares, mientras que los subtipos se diferencian sustancialmente entre sí. Se usó MECA II para clasificar haplotipos en subtipos separados por líneas más gruesas.

En la Figura 2 se muestra un árbol filogenético sin enraizar de subtipos de haplotipos de PAI-1 identificados en la Figura 1. La Figura 2 se dibujó usando MECA II en la que la longitud de la línea refleja la distancia evolutiva relativa. Cada subtipo, mostrado con círculos, se identifica por SNP de marcas de haplotipo (htSNP) que son representativos de subtipos específicos. La recombinación del alelo 4G a partir de su subtipo ancestral (alelo de htSNP 12580 G) parece haberse producido con un subtipo evolutivamente muy distante (alelo htSNP 13985 T).

TABLA 2

Genotipo y frecuencias de alelos para 4G/5G y cuatro htSNP en una cohorte de adultos críticamente enfermos que tenían SRIS

	Frecuencias de genotipos			Frecuencias de alelos	
	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G
837 (4G/5G)	0,27	0,53	0,20	0,53	0,47
	GG	GA	AA	G	A
11312 G/A (9732)	0,77	0,21	0,02	0,88	0,13
	TT	TG	GG	T	G
12580 T/G (11000)	0,35	0,49	0,16	0,59	0,41
	GG	GA	AA	G	A
12750 G/A (11170)	0,63	0,34	0,03	0,80	0,20
	CC	CT	TT	C	T
13985 C/T (12405)	0,81	0,17	0,02	0,90	0,10

Ejemplo 2

Resultado del paciente de subtipos de haplotipos de alelos 4G frente a subtipos de PAI-1

Como se muestra en la Figura 3, dos de los seis subtipos de haplotipos, D y F, se combinan para representar el alelo 4G y se define por: los alelos secundarios 13985 T y 12580 G, respectivamente. Se encontró que pacientes que tenían ambos subtipos del haplotipo 4G no demostraron disminución de la supervivencia en hospital (Figura 3). En realidad, el subtipo que contiene el alelo 13985 T tenía la mayor supervivencia de todos los subtipos - en comparación directa con los resultados notificados para el alelo 4G (HERMANS (1999); MENGES (2001); y WESTENDORP (1999)). El alelo 4G (875) no está similarmente asociado a supervivencia alterada, disfunción de órganos, SRIS, sepsis o choque séptico. A diferencia, aquellos pacientes que tenían el alelo 12580 G tenían una marcada disminución de la supervivencia en hospital en comparación con el alelo 13985 T ($p<0,01$) y en comparación con todos los otros subtipos de haplotipos ($p<0,03$) (Figura 3).

Ejemplo 3

Resultados en pacientes para los genotipos G4/G5

5 Cuando sólo se examinó el polimorfismo 4G/5G se encontraron resultados intermedios que reflejaban la adición del aumento de supervivencia del subtipo de haplotipos, que contiene el alelo 13985 T, respecto a la disminución de supervivencia del subtipo de haplotipos, que contiene el alelo 12580 G. La distribución de frecuencias de los genotipos 4G/4G, 4G/5G y 5G/5G fueron el 26,6%, 52,1% y 20,1% que es similar a las frecuencias notificadas en otros caucásicos críticamente enfermos (MENGES T y col. *Lancet* (2001) 357(9262):1096-7). Las tasas de supervivencia en hospital fueron el 54% para grupos 4G/4G, el 61% para 4G/5G y el 74% para 5G/5G, que no eran estadísticamente significativamente diferentes ($p=0,09$). Sin embargo, el alelo 4G permaneció asociado a significativamente pocos días vivo y libre de disfunción respiratoria ($p<0,05$), disfunción hepática ($p<0,05$) y disfunción neurológica ($p<0,05$) (TABLA 3). Las puntuaciones DAF cardiovasculares, renales y de coagulación no fueron significativamente diferentes entre genotipos 4G/5G (Tabla 3). Estos resultados se apoyaron por los hallazgos de ninguna diferencia en DAF de vasotensores (medición adicional de la función cardiovascular), pero DAF de ventilador significativamente menor (medición adicional de la función respiratoria) en pacientes que tenían el alelo 4G (Tabla 3). Se encontró que aquellos pacientes que tenían el alelo 4G tenían un aumento significativo de la duración de SRIS (DAF de SRIS: 19,8 de 28 para 4G/4G, 20,8 para 4G/5G, 23,4 para 5G/5G), una tendencia al aumento de aparición de sepsis (94% para 4G/4G, 99% para 4G/5G, 74% para 5G/5G, $p=0,08$) y un aumento significativo en la aparición de choque séptico (94% para 4G/4G, 99% para 4G/5G, 74% para 5G/5G, $p=0,04$) durante el periodo de estudio de 28 días.

TABLA 3

Días vivo y libre de insuficiencia orgánica (de un posible de 28) para genotipos del polimorfismo 4G/5G de PAI-1 en una cohorte de adultos críticamente enfermos que tenían SRIS

25

	4G/ 4G	4G/ 5G	5G/ 5G	p
30 Cardiovascular	18, 5±2, 6	19, 7±1, 8	22, 3±2, 7	0, 07
35 Vasotensores (marcador de disfunción cardiovascular)	17, 2±2, 6	18, 6±1, 9	21, 0±2, 8	0, 08
Respiratorio	7, 2±2, 1	5, 9±1, 4	12, 3±2, 9	0, 02
40 Ventilador (marcador de disfunción respiratoria)	12, 7±2, 8	13, 9±1, 9	17, 0±2, 9	0, 04
45 Renal	16, 5±2, 7	16, 3±2, 0	18, 0±3, 3	0, 52
Soporte renal (marcador de disfunción renal)	18, 7±2, 7	18, 1±2, 0	19, 4±3, 2	0, 85
50 Hepático	18, 0±2, 8	19, 0±1, 9	23, 0±2, 8	0, 02
Hematológico				
55 Neurológico	18, 4±2, 6	19, 5±1, 9	22, 8±2, 6	0, 04

Media ± intervalo de confianza del 95%

60

Ejemplo 4

Resultados en pacientes para genotipos 12580 frente a genotipos 4G/5G de PAI-1

65 Para evaluar la duración de la disfunción de órganos y para corregir la puntuación de la disfunción de órganos para muertes en el periodo de observación de 28 días se calcularon los días vivo y libre (DAF) de disfunción de órganos. Durante cada periodo de 24 horas para cada variable, DAF se puntuó como "1" si el paciente estaba vivo y libre de disfunción de órganos (disfunción de órganos normal o leve - Tabla 1C). DAF se puntuó como "0" si el paciente

ES 2 346 881 T3

tenía disfunción de órganos (moderada, grave o extrema - Tabla 1C) o no estaba vivo durante el periodo de 24 horas. Cada uno de los 28 días después del ingreso en la UCI se puntuó en cada paciente de este modo. Por tanto, la menor puntuación posible para cada variable fue cero y la mayor puntuación posible fue 28. Una puntuación baja es indicativa de más disfunción de órganos ya que serían menos días vivo y libre de disfunción de órganos. No hubo diferencias significativas para los genotipos 12580 de PAI-1 entre grupos (tanto GG/GT frente a TT como GG, GT y TT por separado como se muestra en las Tablas 4A y 4B más adelante) con respecto a la edad, sexo, puntuación APACHE II y porcentaje de pacientes ingresados con diagnóstico quirúrgico. Similarmente, no hubo diferencias significativas para los genotipos 4G/5G de PAI-1 entre grupos (tanto 5G/5G frente a 5G/4G como 4G/4G o cualquier 4G por separado como se muestra en las Tablas 5A y 5B más adelante).

TABLA 4A

	Edad	Hembras en %	Puntuación APACHE II	Diagnóstico quirúrgico en %
GG	58 ± 2	38	24 ± 1	27
GT	57 ± 1	35	23 ± 1	20
TT	57 ± 1	41	23 ± 1	28
Valor p	NS	NS	NS	NS

Estadística inicial de 587 pacientes caucásicos con SRIS agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1. No se observaron diferencias significativas en la edad, sexo, puntuación APACHE II o diagnóstico quirúrgico en el ingreso entre grupos del genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT o TT).

TABLA 4B

	Edad	Hembras en %	Puntuación APACHE II	Diagnóstico quirúrgico en %
GG/GT	58 ± 1	36	23 ± 1	22
TT	57 ± 1	41	23 ± 1	28
Valor p	NS	NS	NS	NS

Estadística inicial de 587 caucásicos con SRIS agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT). No se observaron diferencias significativas en edad, sexo, puntuación APACHE II o diagnóstico quirúrgico en el ingreso entre grupos.

TABLA 5A

	Edad	Hembras en %	Puntuación APACHE II	Diagnóstico quirúrgico en %
5G/5G	59 ± 2	42	22 ± 1	29
5G/4G	57 ± 1	34	22 ± 1	26
4G/4G	61 ± 2	33	21 ± 1	37
Valor p	NS	NS	NS	NS

Estadística inicial de 314 caucásicos con SRIS agrupados por el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 (5G/5G, 5G/4G y 4G/4G). No se observaron diferencias significativas en la estadística inicial.

TABLA 5B

	Edad	Hembras en %	Puntuación APACHE II	Diagnóstico quirúrgico en %
Cualquier 4G	58 ± 1	34	22 ± 1	29
5G/5G	59 ± 2	42	22 ± 1	29
Valor p	NS	NS	NS	NS

Estadística inicial de 314 caucásicos con SRIS agrupados por el alelo 4G/5G (837) de PAI-1 (cualquier 4G frente a 5G/5G). No se observaron diferencias significativas en la estadística inicial.

Los pacientes que tenían haplotipos que contenían el alelo 12580 G tenían una marcada disfunción de órganos de los sistemas de órganos respiratorio ($p < 0,05$), renal ($p < 0,05$), hepático ($p < 0,05$) y neurológico ($p < 0,05$) durante el periodo de estudio de 28 días (Figura 4). Días vivo y libre de todas las disfunciones de órganos para 12580 GG fueron 1,8, GT 4,6 y TT 8,2 ($p < 0,01$). Por tanto, el alelo 12580 G estaba asociado a insuficiencia orgánica global marcadamente peor. Además, el alelo 12580 G estaba asociado a más SRIS ($p < 0,05$), más sepsis ($p < 0,05$) y más choque séptico ($p < 0,05$) (Figuras 5 y 6). Por tanto, el alelo 12580 G estaba asociado a fenotipo clínico marcadamente adverso expresado como disminución de la supervivencia, peor disfunción de órganos y peor SRIS.

Se encontró que no había diferencia estadísticamente significativa o tendencia en DAF cuando estaban agrupados por el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 (Figuras 8 A, 8B, 10 A, 10 B, 12 A, y 12 B). Sin embargo, cuando los pacientes se agruparon por el genotipo 12580 de PAI-1, distintas tendencias en DAF se asociaron a un aumento del número de alelo 12580 G.

En la Figura 7A se muestra días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado) en 587 caucásicos críticamente enfermos con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). Aquellos pacientes que poseían el alelo 12580 G tenían una fuerte tendencia a menos días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica basándose en el número de copias del alelo 12580 G que tenían. Aquellos pacientes con 2 copias del alelo 12580 G (N=98) tuvieron el menor días vivo y libre de disfunción respiratoria (13 días) y ventilación mecánica (12 días). Los pacientes con sólo una copia del alelo 12580 G (N=284) tenían valores intermedios para días vivo y libre de disfunción respiratoria (13 días) y ventilación mecánica (13 días). Los pacientes con 0 copias del alelo 12580 G (es decir, homocigotos TT; N=205) tenían el mayor número de días vivo y libre de disfunción respiratoria (15 días) y ventilación mecánica (14 días).

Similarmente, la Figura 7B muestra días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT) en 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS. Aquellos pacientes tanto con 1 como 2 copias del alelo 12580 G (GG o GT, N=382) tenían una fuerte tendencia hacia menos días vivo y libre de disfunción respiratoria ($p=0,057$) y ventilación mecánica ($p=0,077$) en comparación con aquellos pacientes que tenían 0 copias del alelo G (es decir, homocigotos 12580 TT, N=205).

Las Figuras 8A y 8B muestran días vivo y libre de disfunción respiratoria y ventilación mecánica por el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 (mostrando 4G/4G, 4G/5G y 5G/5G por separado y cualquier 4G frente a 5G/5G) en 314 caucásicos críticamente enfermos con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). No se observaron diferencias significativas o tendencias en DAF de disfunción respiratoria o ventilación mecánica basándose en el genotipo 4G/5G de PAI-1.

En la Figura 9A se muestran días vivo y libre de lesión pulmonar aguda (LPA) y la relación de P_aO_2/F_iO_2 (P/F) superior a 300 mm de Hg por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado) en 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS. Aquellos pacientes que tenían el alelo 12580 G tenían una tendencia hacia menos días vivo y libre de LPA y $P/F < 300$ basándose en el número de copias del alelo 12580 G que tenían. Los pacientes con 2 copias del alelo 12580 G (N=98) tuvieron el menor días vivo y libre de LPA (16 días) y $P/F < 300$ (5 días). Los pacientes con 1 copia del alelo 12580 G (N=284) tenían valores intermedios para días vivo y libre de LPA (16 días) y $P/F < 300$ (5 días). Los pacientes con 0 copias del alelo 12580 G tenían el mayor número de días vivo y libre de LPA (17 días) y $P/F < 300$ (7 días).

Similarmente, la Figura 9B muestra días vivo y libre de lesión pulmonar aguda y $P_aO_2/F_iO_2 < 300$ mm de Hg por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT) para 587 caucásicos con SRIS. Aquellos pacientes tanto con 1 como 2 copias del alelo 12580 G (GG o GT, N=382) tenían una tendencia hacia menos días vivo y libre de lesión pulmonar aguda (16 días) y $P_aO_2/F_iO_2 < 300$ mm de Hg (5 días) en comparación con aquellos pacientes con 0 copias del alelo 12580 G (17 y 7 días, resp.; N=205).

La Figura 10A muestra días vivo y libre de lesión pulmonar aguda (LPA) y la relación de P_aO_2/F_iO_2 (P/F) superior a 300 mm de Hg por genotipo 4G/5G de PAI-1 (837) (mostrando 4G/4G, 4G/5G y 5G/5G por separado) en 314 caucásicos críticamente enfermos con SRIS. No se observaron diferencias significativas o tendencias en DAF de LPA o $P/F < 300$ basándose en el genotipo 4G/5G de PAI-1. Similarmente, la Figura 10B muestra días vivo y libre de lesión pulmonar aguda y $P_aO_2/F_iO_2 < 300$ mm de Hg por alelo 4G/5G de PAI-1 (cualquier 4G frente a 5G/5G) en 314 caucásicos críticamente enfermos con SRIS. No se observó diferencia significativa o tendencia en DAF de LPA basándose en el alelo 4G/5G de PAI-1. Se observó una tendencia hacia menos DAF de $P/F < 300$ en el grupo “cualquier 4G”, pero esta tendencia no era tan significativa como la observada basándose en el alelo 12580 de PAI-1 (Figura 9B).

En la Figura 11A se muestra días vivo y libre de uso de esteroides por el genotipo 12580 de PAI-1 en 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS. Los pacientes con 2 copias del alelo 12580 G (N=98) tuvieron el menor días vivo y libre de uso de esteroides (15 días). Los pacientes con 1 copia del alelo 12580 G (N=284) tuvieron valores similares para días vivo y libre de uso de esteroides (15 días). Los pacientes con 0 copias del alelo 12580 G (N=205) tenían el mayor número de días vivo y libre de uso de esteroides (17 días). Similarmente, la Figura 11B muestra días vivo y libre de uso de esteroides por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT) para 587 caucásicos críticamente enfermos con SRIS. Aquellos pacientes que tenían tanto 1 como 2 copias del alelo 12580 G (es decir, GG o GT; N=382) tenían una fuerte tendencia hacia menos días vivo y libre de uso de esteroides (15 días) en comparación con aquellos pacientes con 0 copias (17 días; N=205).

La Figura 12A muestra días vivo y libre de uso de esteroides por el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 en caucásicos críticamente enfermos con SRIS (agrupados 4G/4G, 4G/5G y 5G/5G por separado). No se observó diferencia significativa o tendencia en DAF de uso de esteroides basándose en el genotipo 4G/5G de PAI-1. Similarmente, la Figura 12B muestra días vivo y libre de uso de esteroides por 4G/5G de PAI-1 (837) cuando los mismos pacientes en 12A se agrupan como cualquier 4G frente a 5G/5G. De nuevo no se observó diferencia significativa o tendencia en DAF de uso de esteroides basándose en el alelo 4G/5G de PAI-1.

Ejemplo 5

Resultados en pacientes para genotipos 12580 de PAI-1 frente a genotipos 4G/5G en pacientes con cirugía

Los niveles de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) se midieron en 67 pacientes caucásicos con cirugía cardiovascular que tenían derivación cardiopulmonar. Los niveles en suero se midieron por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Immulyse PAI-1, BioPool International) y se presentaron basándose en el genotipo 12580 de PAI-1 (Figuras 13A/B, 15A/B, 16 y 17A/B). No se observaron diferencias significativas entre grupos del genotipo 12580 de PAI-1 basándose en la edad o sexo (como se muestra en las Tablas 6A y 6B a continuación).

TABLA 6A

	Edad	Hembras en %
GG	74 ± 5	60
GT	62 ± 2	27
TT	68 ± 2	33
Valor p	NS	NS

Estadística inicial para 67 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba y se habían medido los niveles de PAI-1 en suero. No se observaron diferencias significativas en la edad o sexo entre grupos del genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT).

TABLA 6B

	Edad	Hembras en %
GG/GT	64 ± 2	31
TT	68 ± 2	33
Valor p	NS	NS

Estadística inicial para 67 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba y se habían medido los niveles de PAI-1 en suero. No se observaron diferencias significativas en la edad o sexo entre grupos del genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT).

Similarmente, los niveles de PAI-1 también se midieron en 55 pacientes caucásicos con cirugía cardiovascular que tenían derivación cardiopulmonar y para fines de comparación se presentaron los niveles en suero basándose en el genotipo 4G/5G de PAI-1 (837) (Figuras 14A/B y 18A/B). Se observó una diferencia significativa en la proporción de pacientes hembra (mostrado en las Tablas 7A y 7B más adelante), y esto se representa en los análisis posteriores.

TABLA 7A

	Edad	Hembras en %
4G/4G	68 ± 2	53
4G/5G	64 ± 2	15
5G/5G	68 ± 2	36
Valor p	NS	0,037

Estadística inicial para 55 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba y se habían medido los niveles de PAI-1 en suero. No se observó diferencia significativa en la edad entre los grupos de 4G/5G de PAI-1 (4G/4G, 4G/5G y 5G/5G). Se observó una diferencia significativa en la proporción de pacientes hembra, y esto se representa en los análisis posteriores.

TABLA 7B

	Edad	Hembras en %
Cualquier 4G	66 ± 2	29
5G/5G	68 ± 2	36
Valor p	NS	NS

Estadística inicial para 55 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba y se habían medido los niveles de PAI-1 en suero. No se observó diferencia significativa en la edad o sexo entre grupos del genotipo 4G/5G de PAI-1 (cualquier 4G frente a 5G/5G).

Sorprendentemente, se encontró que no había diferencia estadísticamente significativa (o incluso una tendencia) en niveles en suero de PAI-1 e índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) en pacientes con 4 horas de posoperatorio después de la cirugía de derivación cardiopulmonar cuando se agruparon por el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1. Sin embargo, cuando los pacientes se agruparon por el genotipo 12580 de PAI-1, una disminución estadísticamente significativa en niveles en suero de PAI-1 se asoció a un aumento del número del alelo 12580 G, tanto pos como preoperatoriamente. Similarmente, el genotipo 12580 de PAI-1 mostró una disminución estadísticamente significativa en IRVS asociada posoperatoriamente al alelo 12580 G. Por tanto, el alelo 12580 G de PAI-1 se asoció a más vasodilatación (como se muestra por el menor IRVS) y a menores niveles de PAI-1 después de la cirugía cardíaca que 12580 T de PAI-1. Esto representa la confirmación independiente en una cohorte independiente de pacientes que tenían cirugía cardíaca de los hallazgos de 12580 G de PAI-1 en la cohorte de UCI en la que 12580 G de PAI-1 se asoció a peor supervivencia y disfunción de órganos en la cohorte de UCI y menor IRVS y menores niveles de PAI-1 en la cohorte de cirugía cardíaca.

En la Figura 13A se muestran niveles medios en suero de PAI-1 preoperatorios en 24 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado). Los homocigotos 12580 TT (N=3) tenían un nivel medio de PAI-1 en suero preoperatorio de 146,9 ng/ml, los heterocigotos GT (N=14) tenían un nivel medio de PAI-1 en suero preoperatorio de 102,2 ng/ml y los homocigotos GG (N=7) tenían un nivel medio en suero de PAI-1 preoperatorio de 84,5 ng/ml. Está presente una tendencia estadísticamente significativa hacia menores niveles de PAI-1 en suero al aumentar el número de copias del alelo 12580 G (p=0,044). Las estadísticas se realizaron en datos transformados logarítmicamente ya que los niveles no se distribuyeron normalmente.

En la Figura 13B se muestran niveles medios de PAI-1 en suero preoperatorios en 24 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT). Aquí como antes, los homocigotos TT (N=3) tenían niveles medios de PAI-1 en suero preoperatorios mayores de 154,4 ng/ml en comparación con aquellos pacientes con tanto los genotipos GG como GT (N=21, nivel medio de PAI-1 en suero de 94,5 ng/ml). La significancia estadística no se alcanza (p=0,077), pero se observa un valor que indica una tendencia. Las estadísticas se realizaron en datos transformados logarítmicamente.

En la Figura 14A se muestran los niveles de PAI-1 en suero medidos tras 4 horas de posoperatorio en 55 pacientes caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar. No se observó diferencia significativa en el nivel

de PAI-1 en suero basándose en el genotipo 4G/5G (837) y ninguno tenía ninguna tendencia en los niveles de PAI-1 basados en estos genotipos. La diferencia en el sexo se incluyó en un modelo de regresión lineal y no tuvo efecto en la falta de significancia estadística. Similarmente, la Figura 14B muestra niveles de PAI-1 en suero medidos 4 horas posoperatorio en 55 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba por cualquier 4G frente a 5G/5G. De nuevo no se observó diferencia significativa en los niveles de PAI-1 en suero basándose en el alelo 4G/5G (837) (cualquier 4G frente a 5G/5G), y en ninguno se observó una tendencia significativa. Las estadísticas se realizaron en datos transformados logarítmicamente.

En las Figuras 15A y 15B se muestran niveles medios de PAI-1 en suero de 67 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba recogidos 4 horas después de la cirugía agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (TT, GT y GG por separado y GG/GT frente a TT). Este grupo incluye como subconjunto aquellos pacientes (N=24) para los que los datos se recogieron en el momento preoperatorio y, por tanto, representa una confirmación de las tendencias observadas en el grupo anteriormente mencionado (es decir, alelo 12580 G asociado a menores niveles de PAI-1 en suero) en un grupo con un mayor tamaño de muestra. Los homocigotos 12580 TT (N=21) tenían los mayores niveles medios de PAI-1 en suero a 195,1 ng/ml, seguidos por los heterocigotos GT con 130,3 ng/ml y los homocigotos GG con 111,3 ng/ml. En la Figura 15B, los homocigotos 12580 TT tenían niveles medios de PAI-1 en suero estadísticamente significativamente mayores posoperatoriamente (195,1 ng/ml) en comparación con aquellos pacientes con tanto los genotipos GT como GG (126,0; $p=0,042$). De nuevo emerge una clara tendencia en la que menores niveles de PAI-1 en suero están asociados a números crecientes del alelo 12580 G. Las estadísticas se realizaron en datos transformados logarítmicamente.

En la Figura 16 se muestran diferencias medias en los niveles de PAI-1 en suero de preoperatorio tras 4 horas de posoperatorio en 24 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba. Aquellos pacientes que eran homocigóticos para el alelo 12580T tenían el mayor aumento en niveles de PAI-1 preoperatorio a posoperatorio (208,0 ng/ml). Los pacientes heterocigóticos tenían un aumento intermedio en niveles de PAI-1 (158,9 ng/ml), y aquellos pacientes que eran homocigóticos para el alelo 12580 G tenían el menor aumento en niveles de PAI-1 en suero preoperatorio a posoperatorio (43,6 ng/ml). Aunque no se alcanzó la significancia estadística, es visible una clara tendencia que indica un menor aumento en los niveles de PAI-1 tras la cirugía de derivación cardiopulmonar con número de copias creciente del alelo 12580 G de PAI-1.

En la Figura 17A se muestra el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) tras 4 horas de posoperatorio en 66 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba, agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG, GT y TT por separado). El IRVS se calcula como $\text{IRVS} = (\text{tensión arterial media} - \text{tensión venosa central}) / \text{índice cardíaco}$ y se expresa como $\text{dinas/s}\cdot\text{cm}^{-5}$. El alelo 12580 G de PAI-1 está asociado a una tendencia estadísticamente significativa hacia un IRVS medio más bajo 4 horas posoperatorio basándose en el número de copias de alelos: los homocigotos GG tienen los valores de IRVS más bajos ($1493,9 \pm 144,8 \text{ dinas/s}\cdot\text{cm}^{-5}$), los heterocigotos GT tienen valores de IRVS intermedios ($1629,7 \pm 61,5 \text{ dinas/s}\cdot\text{cm}^{-5}$) y los homocigotos TT tienen los mayores valores de IRVS ($1780,4 \pm 64,6 \text{ dinas/s}\cdot\text{cm}^{-5}$). Esta tendencia es significativa al nivel $\alpha 0,05$ ($p=0,028$).

Similarmente, en la Figura 17B se muestra el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) tras 4 de horas posoperatorio en 66 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 12580 de PAI-1 (GG/GT frente a TT). El IRVS se calculó como se describe anteriormente para la Figura 17A. El alelo 12580 G de PAI-1 (aquí como homocigotos GG o heterocigotos GT) se muestra que está significativamente asociado a un IRVS medio más bajo 4 horas posoperatorio que el alelo T ($1604,4 \pm 57,8 \text{ dinas/s}\cdot\text{cm}^{-5}$ frente a $1780,4 \pm 64,6 \text{ dinas/s}\cdot\text{cm}^{-5}$, respectivamente; $p=0,050$).

La Figura 18A muestra el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS) tras 4 horas de posoperatorio en 364 caucásicos que se sometieron a cirugía de derivación cardiopulmonar con bomba agrupados por el genotipo 4G/5G (837) de PAI-1 (4G/4G, 4G/5G y 5G/5G por separado). El IRVS se calcula como $\text{IRVS} = (\text{tensión arterial media} - \text{tensión venosa central}) / \text{índice cardíaco}$ y se expresa como $\text{dinas/s}\cdot\text{cm}^{-5}$. No se observó diferencia significativa o tendencia en el IRVS 4 horas posoperatorio basándose en el genotipo 4G/5G de PAI-1. Similarmente, en la Figura 18B en la que los pacientes se agruparon por el alelo 4G/5G (837) de PAI-1 (cualquier 4G frente a 5G/5G). El IRVS se calcula como antes para 18A y de nuevo no se observó diferencia significativa o tendencia en el IRVS 4 horas posoperatorio basándose en el alelo 4G/5G de PAI-1.

55 *Análisis estadístico*

Los inventores compararon medidas de gravedad de enfermedad usando modelos dominantes y co-dominantes. Los inventores probaron las diferencias entre grupos de genotipos usando ANOVA para datos continuos y una prueba exacta de Fisher para datos discretos. Cuando fue apropiado también se usaron la prueba de la t de Student y regresión lineal.

El tamaño de muestra descrito en este documento (260) se compara con tamaños de muestra en traumatismo de 61 (MENGES T y col. *Lancet* (2001) 357(9262):1096-7), en meningococcemia pediátrica de 175 (DAWSON y col. (1993)) y choque séptico meningocócico en adultos de 50 (WESTENDORP RG y col. *Lancet* (1999) 354(9178):561-3). Otra posible fuente de error en estudios de asociación es la mezcla de poblaciones (CARDON LR y BELL JI *Nature Reviews Genetics* (2001) 2:91-9). Este asunto se trató limitando el análisis a caucásicos y también porque este grupo comprendía la mayoría de los pacientes disponibles por los inventores para el estudio.

Resumen

El alelo 12580 G de PAI-1 está asociado a mayores pruebas de SRIS y disfunción cardiovascular y respiratoria grave en una población con SRIS críticamente enferma y en una población con SRIS pos DCP. La población con SRIS críticamente enferma demuestra que el SRIS grave en los pacientes con el genotipo GG se asoció a SRIS más grave y más insuficiencia cardiovascular y respiratoria (incluyendo más lesión pulmonar aguda, más uso de vasotensores, más uso de esteroides), pero también a tendencias a disfunción de sistemas de órganos adicional y, lo que es más importante, a la disminución de la supervivencia: estas observaciones se confirmaron en una población con SRIS análoga pero completamente independiente de pacientes críticamente enfermos que tenían DCP. En la población de DCP, el SRIS se indujo mediante cirugía cardíaca y el propio proceso de derivación cardiopulmonar sin pruebas de infección. Las pruebas del aumento de SRIS en aquellos pacientes que tenían el genotipo GG en esta población se proporciona por la observación de mayor reducción en el índice de resistencia vascular sistémica (IRVS).

Los pacientes críticamente enfermos con el alelo 12580 G tenían resultados significativamente peores como se indica por menor supervivencia, más SRIS, insuficiencia cardiovascular y respiratoria más grave y fuertes tendencias a disfunción hepática, renal, neurológica y de coagulación más grave. El escaso fenotipo clínico de los pacientes que tenían el alelo 12580 G también se asoció a un mayor uso de corticosteroides. Se sospecha que el motivo del aumento de uso de corticosteroides (véanse las Figuras 11A y B) es que los médicos juzgaron que había una mayor necesidad de tratamiento con esteroides para choque grave e insuficiencia respiratoria posiblemente prolongada.

En este documento se describen haplotipos que son novedosos en su capacidad para predecir el resultado del paciente debido a inflamación, y haplotipos que son mucho más funcionales en la descripción del riesgo del paciente que el polimorfismo 4G/5G previamente descrito. Como resultado, en este documento se proporciona una mejor estrategia para predecir qué pacientes tienen el mayor riesgo de un resultado adverso.

Aquí se muestra que el alelo 4G de PAI-1 va a dividirse en dos subtipos de haplotipos distintos como resultado de un acontecimiento de recombinación remoto. La inspección indica que se produjo un acontecimiento recombinante entre el sitio 4G/5G (posición 837) en la región promotora y la posición 4588 (véase la Figura 1). En esencia, se produjo un “experimento natural” en el que la región promotora que contiene el alelo 4G en cuestión se recombinó con un subtipo de haplotipos completamente diferente (Figura 2). El genotipado de *Pan troglodytes* (chimpancé) (Figura 2) sugiere que 4G se originó con el subtipo F ancestral (definido por el alelo 12580 G) y se recombinó con el subtipo de haplotipo D evolutivamente más distante (definido por el alelo 13985 T) del gen PAI-1 (Figura 2). Por tanto, este “diseño experimental natural” prueba directamente la hipótesis que la región promotora que contiene 4G es causal porque el alelo 4G está distribuido en dos subtipos de haplotipos diferentes que luego pueden compararse. Se encontró que los dos subtipos de haplotipos 4G (F y D) estaban asociados a resultados muy diferentes. El subtipo de haplotipo 12580 G estaba asociado a supervivencia en hospital significativamente reducida y disfunción de órganos, pero no el subtipo de haplotipo 13985. Por tanto, este “experimento natural” ha llevado a la conclusión que 4G no está asociado a un resultado del paciente o no tan fuertemente.

De los resultados de los inventores, el alelo 4G de PAI-1 no está asociado a un pobre pronóstico. Como se describe en este documento, un SNP dentro del subtipo del haplotipo 12580 G (subtipo F) es un mejor candidato para predecir el resultado del paciente porque el subtipo del haplotipo 12580 G estaba fuertemente asociado a resultados adversos. En el mapa de haplotipos (Figura 1), el alelo 4G (837-) y el alelo 12580 G de PAI-1 se ligaron por alguna medición de desequilibrio de enlace, aunque no un DE completo (estimado para ser aproximadamente $r^2 \approx 0,2$ calculado usando el programa Visual Genotype2 disponible en <http://droog.gs.washington.edu/pga/VG2.html>). Como resultado, el alelo 12580 G se propone en este documento como un mejor factor pronóstico de resultado del paciente que el alelo 4G.

En una cohorte de pacientes críticamente enfermos, teniendo el 95% SRIS, los análisis basados en la estructura de haplotipos del gen PAI-1 sugirieron que el polimorfismo 4G/5G no estaba asociado a resultado adverso. Más bien, un polimorfismo contenido dentro del subtipo de haplotipos definido por el alelo G secundario del polimorfismo 12580 T/G era un mejor candidato. El subtipo del haplotipo 12580 G se asoció a la disminución de supervivencia y el aumento de disfunción de órganos, gravedad de SRIS y a aparición de sepsis y choque séptico. La asociación del subtipo del haplotipo 12580 G a resultado adverso es importante porque muestra que el SNP 4G/5G muy comúnmente notificado no es el mejor factor pronóstico de resultado del paciente. Esto tiene implicaciones para pacientes críticamente enfermos que tienen SRIS y posiblemente para pacientes que tienen otras enfermedades (por ejemplo, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio) en los que 4G/5G se ha notificado como asociado a resultado adversos.

El alelo 12580 G de PAI-1 se asoció a menores niveles de PAI-1 en suero (Figuras 13A/B y 15A/B) y a menos días vivo y libre de disfunción de órganos (respiratoria, lesión pulmonar aguda), ayuda (ventilación mecánica y uso de esteroides) y está asociado a índice de resistencia vascular sistémica significativamente menor en pacientes con cirugía cardíaca. Por tanto, el alelo 12580 G es un indicador novedoso de escaso resultado (supervivencia y días vivo y libre de disfunción de órganos como se describe anteriormente) y niveles de PAI-1 en suero más bajos.

En conclusión, el polimorfismo 4G/5G de PAI-1 no es tan buen factor pronóstico de resultado en pacientes con SRIS, sino que, un polimorfismo contenido dentro del subtipo de haplotipos definido por el alelo G secundario del polimorfismo 12580 T/G es un mejor candidato.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un pronóstico para un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria, comprendiendo el método determinar un genotipo para uno o más sitios de polimorfismo en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) para el paciente, en el que dicho genotipo es indicativo de una capacidad del paciente para recuperarse de una afección inflamatoria, siempre que el uno o más sitios de polimorfismo no sean únicamente un polimorfismo en un sitio correspondiente a la posición 837 de la SEQ ID NO.: 1.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más sitios de polimorfismo incluyen la posición 12580 de LA SEQ ID NO.: 1.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más sitios de polimorfismo se seleccionan de las posiciones 5645, 7121, 7437, 8070, 8406, 9463, 9466, 12219, 12580, 13889 y 14440 en la SEQ ID NO.: 1.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el genotipo comprende una combinación de dos o más sitios de polimorfismo, seleccionándose la combinación del grupo de posiciones correspondientes a la SEQ ID NO.: 1 constituidas por:

664 A y 2037 T;

664 A y 2362 -;

664 A y 2852 A;

664 A y 5834 A;

837- y 2037 T;

837 - y 2362 -;

837 - y 2852 A;

837 - y 5834 A;

una de	5878 G	y una de	7365 T	y una de	4588 T
	7343 G		7729 +		5404 G
	13605 A		7771 A		5686 A
			12750 A		5984 A
					11312 A; y

una de	2846 A y 10381 T	y una de	7365 T	y una de	4588 T
--------	------------------	----------	--------	----------	--------

	6821 T y 10381 T		7729 +		5404 G
--	------------------	--	--------	--	--------

	9759 G y 10381 T		7771 A		5686 A
--	------------------	--	--------	--	--------

			12750 A		5984 A
--	--	--	---------	--	--------

					11312 A.
--	--	--	--	--	----------

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además comparar el genotipo así determinado con genotipos conocidos que son indicativos de un pronóstico para la recuperación de la misma afección inflamatoria que para el paciente u otra afección inflamatoria.

6. El método de la reivindicación 1 a 5, en el que dicha determinación del genotipo se realiza en una muestra de ácido nucleico del paciente.

7. El método una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicha determinación de genotipo comprende uno o más de:

(a) análisis de la longitud de fragmentos de restricción;

(b) secuenciación;

(c) hibridación;

- (d) ensayo de ligadura de oligonucleótidos;
- (e) amplificación por ligadura-círculo rodante;
- 5 (f) ensayo de nucleasa en 5';
- (g) métodos de corrección de lectura por polimerasa;
- (h) PCR específica de alelos; y
- 10 (i) datos de secuencias de lectura.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el genotipo del paciente es indicativo de una disminución de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el pronóstico es indicativo de disfunción cardiovascular o respiratoria grave en pacientes críticamente enfermos.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el genotipo del paciente es indicativo de un aumento de la probabilidad de recuperación de una afección inflamatoria.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el pronóstico es indicativo de menor disfunción cardiovascular o respiratoria grave en pacientes críticamente enfermos.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la afección inflamatoria se selecciona del grupo que está constituido por: sepsis, septicemia, neumonía, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome diséico agudo (SDA), lesión pulmonar aguda, infección, pancreatitis, bacteriemia, peritonitis, absceso abdominal, inflamación debida a traumatismo, inflamación debida a cirugía, enfermedad inflamatoria crónica, isquemia, lesión por isquemia-reperusión de un órgano o tejido, lesión de tejido debida a una enfermedad, lesión de tejido debida a quimioterapia o radioterapia y reacciones a sustancias ingeridas, inhaladas, infundidas, inyectadas o administradas, glomerulonefritis, infección intestinal, infecciones oportunistas y para pacientes que se someten a cirugía mayor o diálisis, pacientes que son inmunodeprimidos, pacientes con agentes inmunosupresores, pacientes con VIH/SIDA, pacientes con presunta endocarditis, pacientes con fiebre, pacientes con fiebre de origen desconocido, pacientes con fibrosis quística, pacientes con diabetes mellitus, pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes con bronquiectasia, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfisema o asma, pacientes con neutropenia febril, pacientes con meningitis, pacientes con artritis séptica, pacientes con infección de las vías urinarias, pacientes con fascitis necrosante, pacientes con otra presunta infección por estreptococos del grupo A, pacientes que han tenido una esplenectomía, pacientes con infección recurrente o presunta por enterococos, otras afecciones médicas y quirúrgicas asociadas al aumento de riesgo de infección, sepsis por grampositivos, sepsis por gramnegativos, sepsis con cultivo negativo, sepsis fúngica, meningococcemia, síndrome pos-bomba, síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, hepatitis, epiglotitis, E. coli 0157:H7, malaria, gangrena gaseosa, síndrome de choque tóxico, tuberculosis micobacteriana, neumonía por *Pneumocystis*, neumonía, leishmaniosis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, fiebre hemorrágica del dengue, enfermedad inflamatoria pélvica, legionela, enfermedad de Lyme, gripe A, virus de Epstein-Barr, encefalitis, enfermedades inflamatorias y autoinmunidad incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, vasculitis sistémica, granulomatosis de Wegener, trasplantes que incluyen corazón, hígado, pulmón, riñón, médula ósea, enfermedad de injerto frente a huésped, rechazo de trasplante, anemia de células falciformes, síndrome nefrótico, toxicidad de agentes tales como OKT3, terapia con citocinas, y cirrosis.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la afección inflamatoria es síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

14. Un método para seleccionar un grupo de pacientes para determinar la eficacia de un fármaco candidato conocido o presunto de ser útil para el tratamiento de una afección inflamatoria, comprendiendo el método determinar un genotipo para uno o más sitios de polimorfismo en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno 1 para cada paciente, en el que dicho genotipo es indicativo de la capacidad del paciente para recuperarse de la afección inflamatoria y clasificar los pacientes basándose en su genotipo, siempre que el sitio de polimorfismo no sea únicamente un polimorfismo en un sitio correspondiente a la posición 837 de la SEQ ID NO.: 1.

15. El método de la reivindicación 14 que comprende además comparar la respuesta del paciente al fármaco candidato basado en el genotipo del paciente.

16. El método de la reivindicación 15, en el que la respuesta del paciente se determina por la capacidad de cada paciente para recuperarse de la afección inflamatoria.

17. El método de la reivindicación 15, en el que el uno o más sitios de polimorfismo se seleccionan de las posiciones 5645, 7121, 7437, 8070, 8406, 9463, 9466, 12219, 12580, 13889 y 14440 en la SEQ ID NO: 1.

Subtipo	Posición																				Frecuencia	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
A	1	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	2	14440
	2	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	2	13985
	3	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	13889
B	4	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	2	13605
	5	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	3	13317
	6	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	13140
C	7	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	13053
	8	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	8	12847
	9	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	5	12750
D	10	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	2	12580
	11	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	2	12219
	12	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	2	11312
E	13	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	10381
	14	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	9759
	15	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	9466
F	16	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	2	9463
	17	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	8511
	18	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	6	8406
	19	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	8092
	20	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	8070
	21	CGG	AAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	AGG	1	7771
																						7729
																						7437
																						7429
																						7365
																						7343
																						7121
																						6821
																						5984
																						5878
																						5834
																						5686
																						5645
																						5404
																						5137
																						4588
																						3508
																						3448
																						3408
																						3404
																						3268
																						2852
																						2846
																						2362
																						2037
																						837
																						664
																						412

FIGURA 1

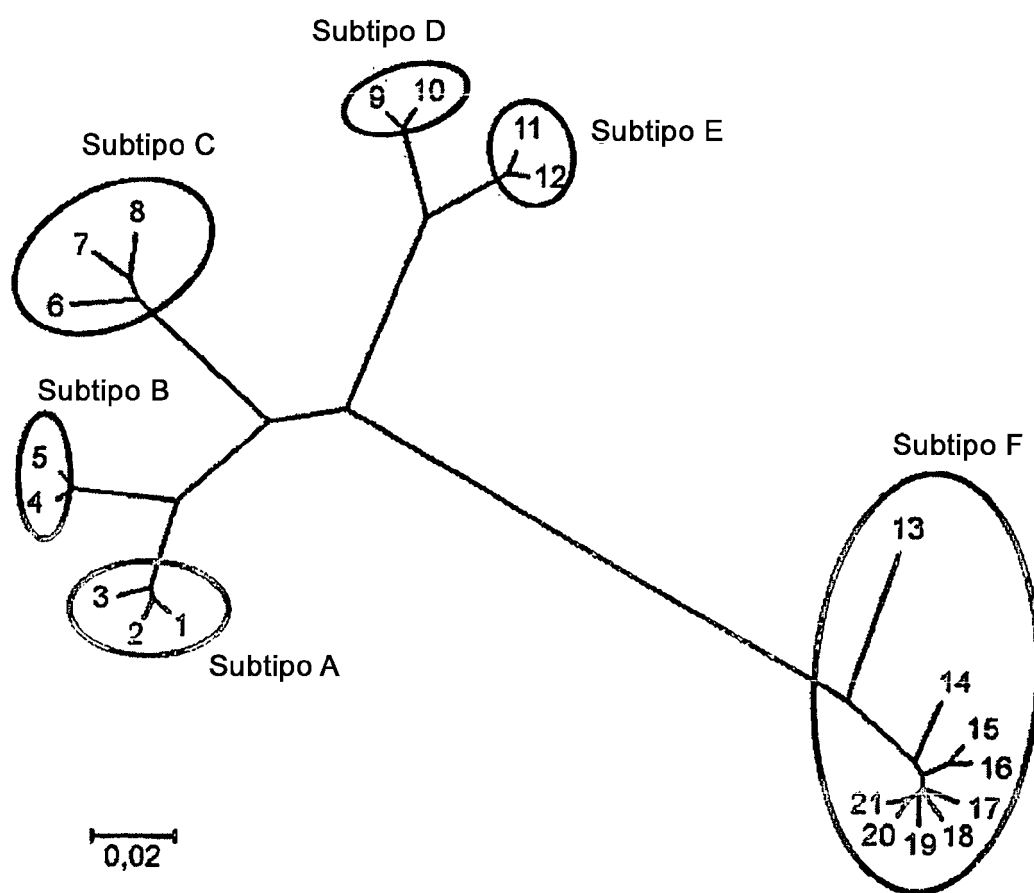


FIGURA 2

FIGURA 3

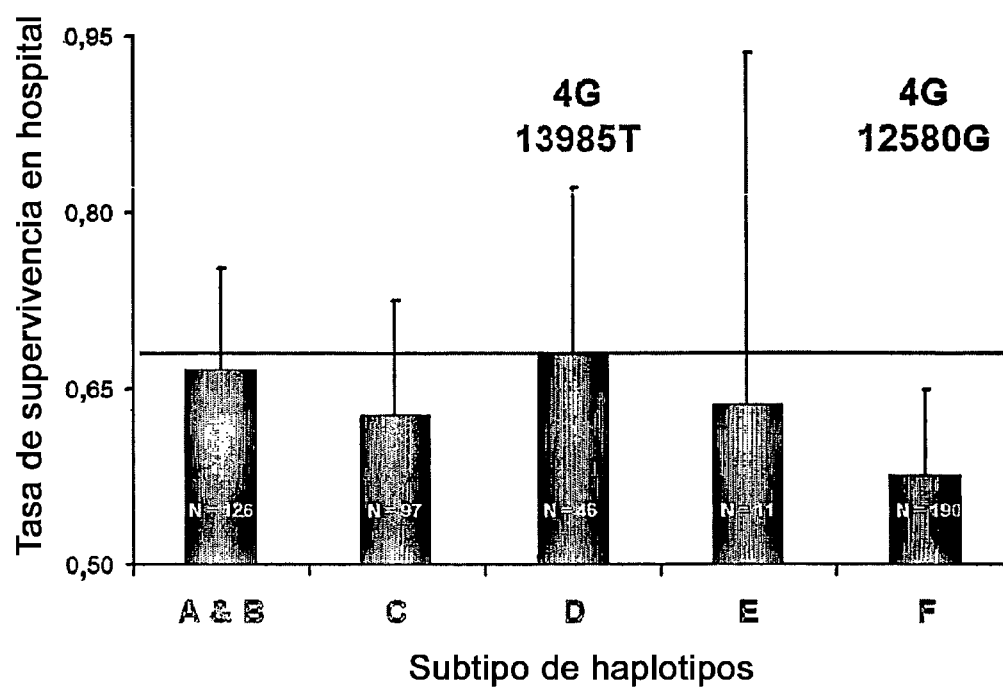


FIGURA 4

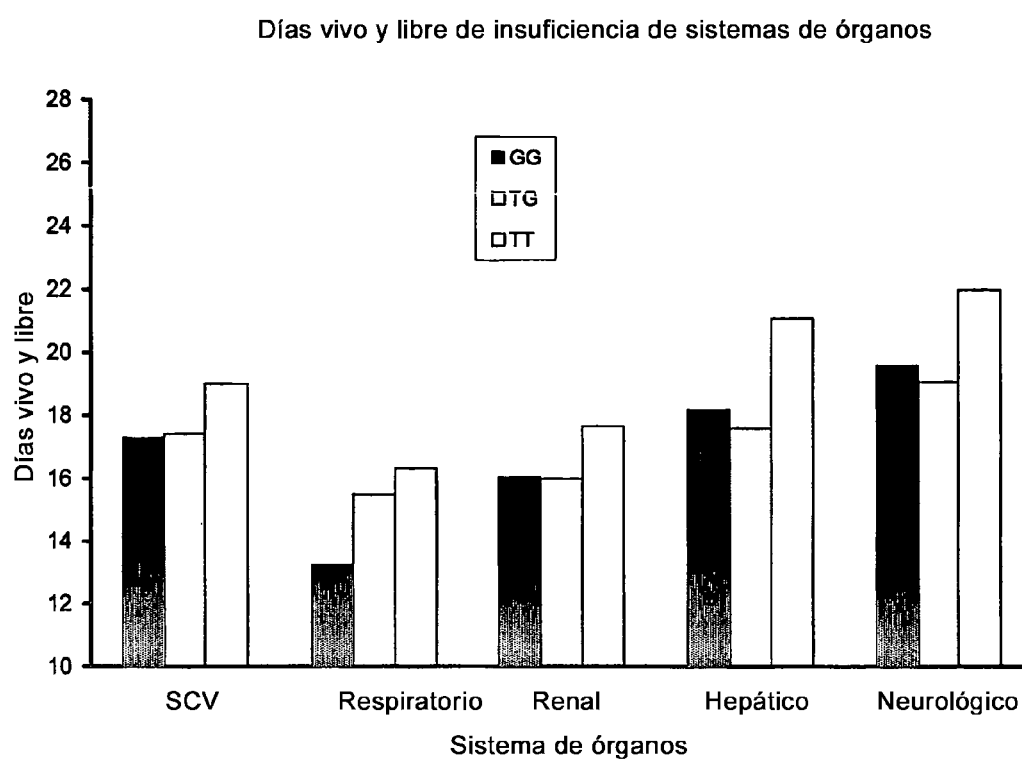


FIGURA 5

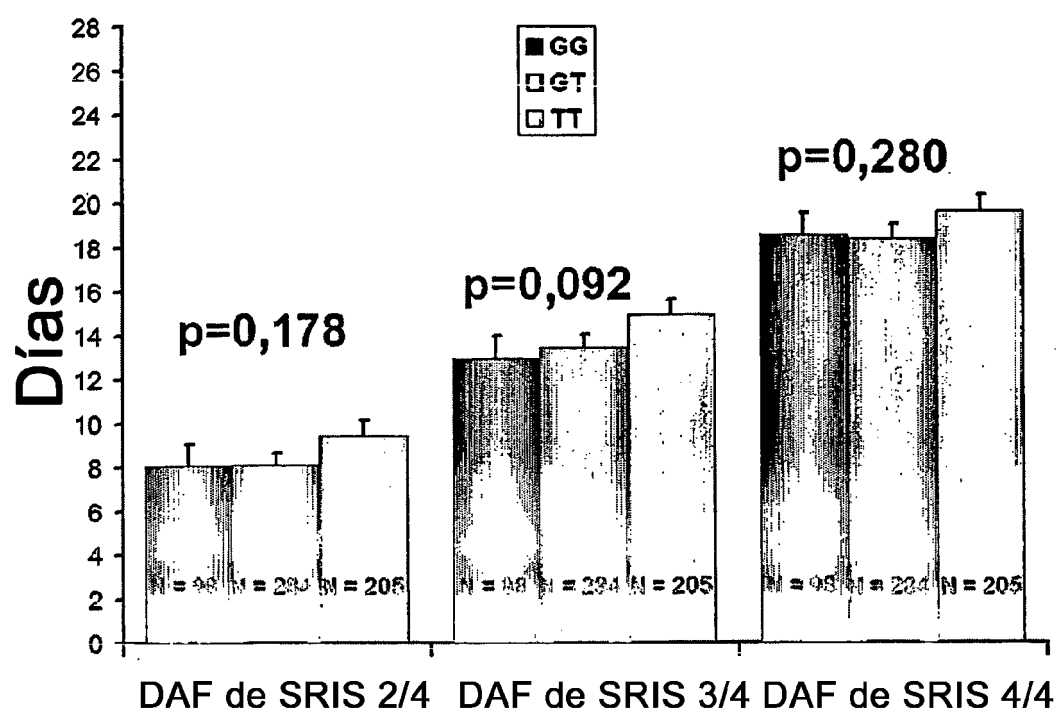


FIGURA 6

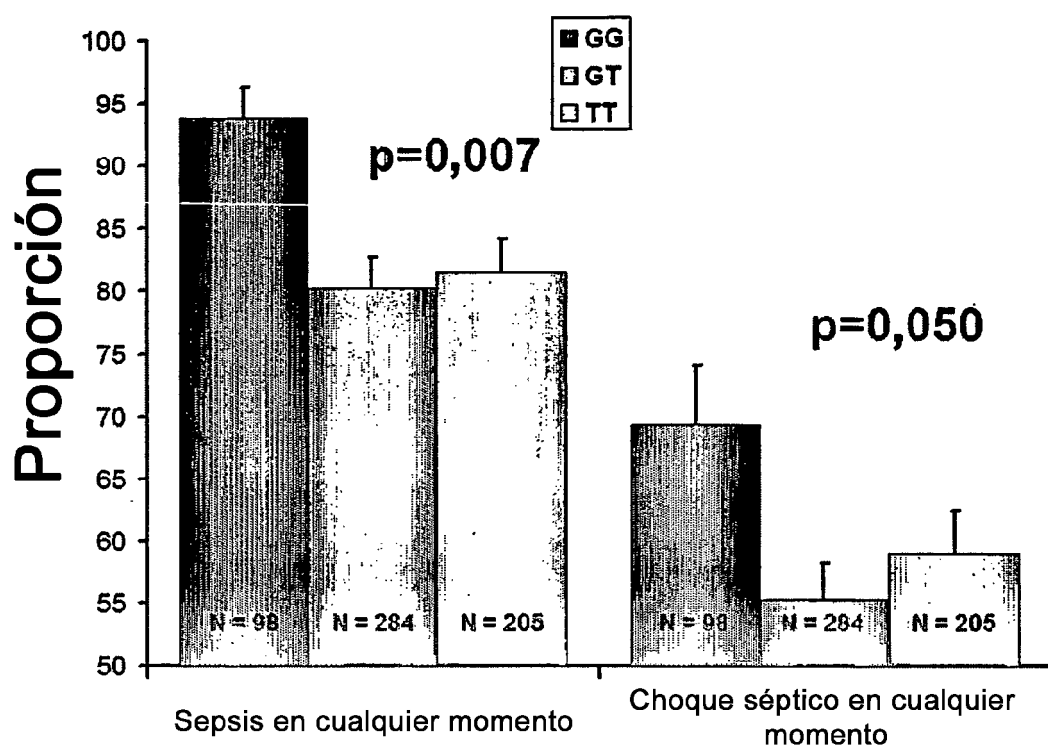


FIGURA 7A

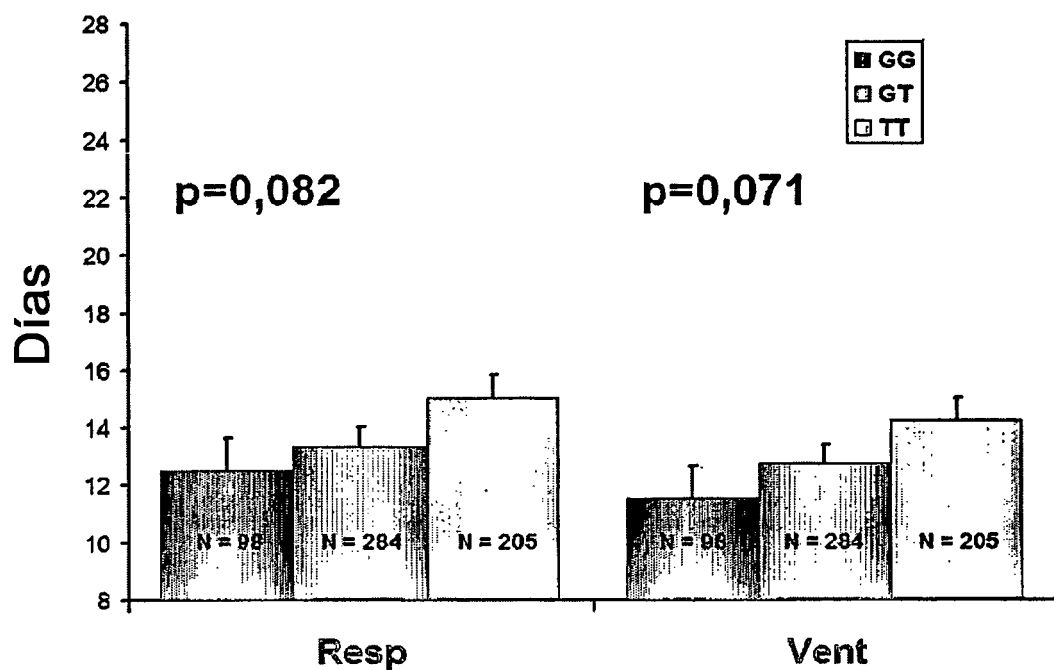


FIGURA 7B

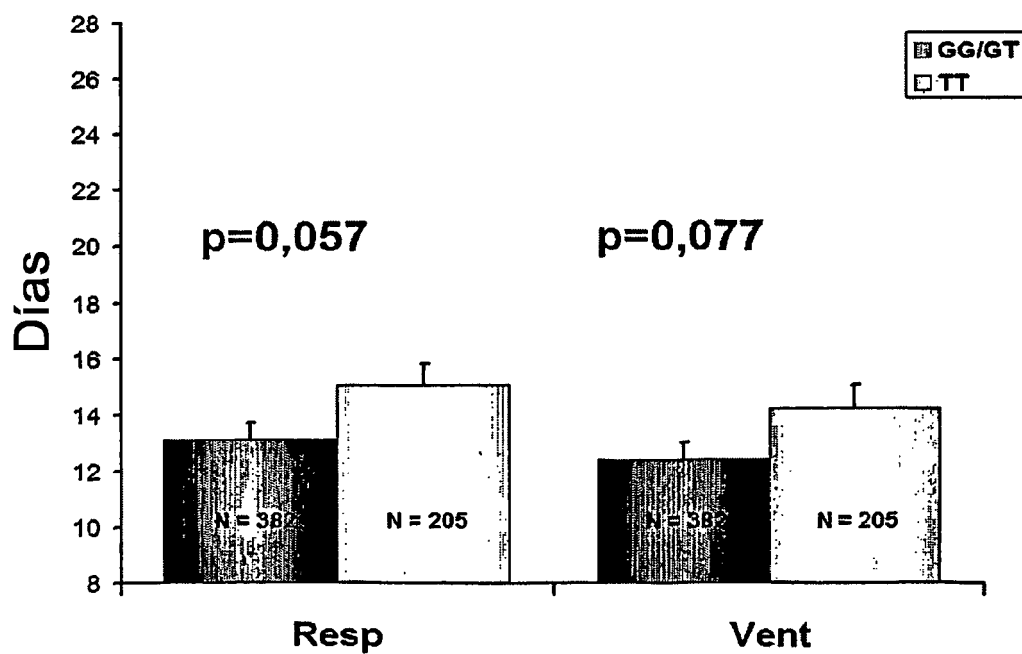


FIGURA 8A

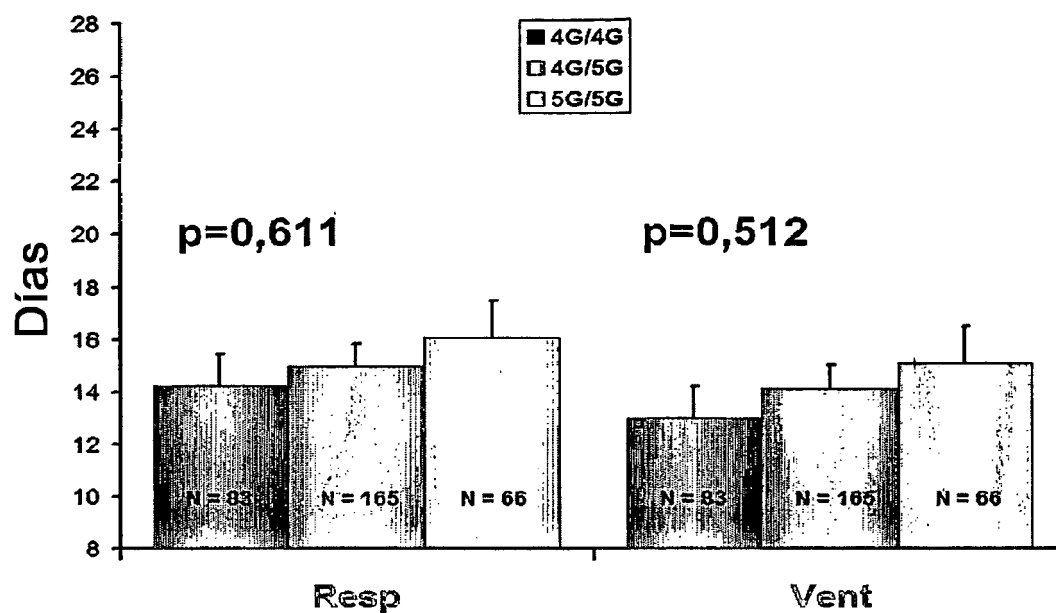


FIGURA 8B

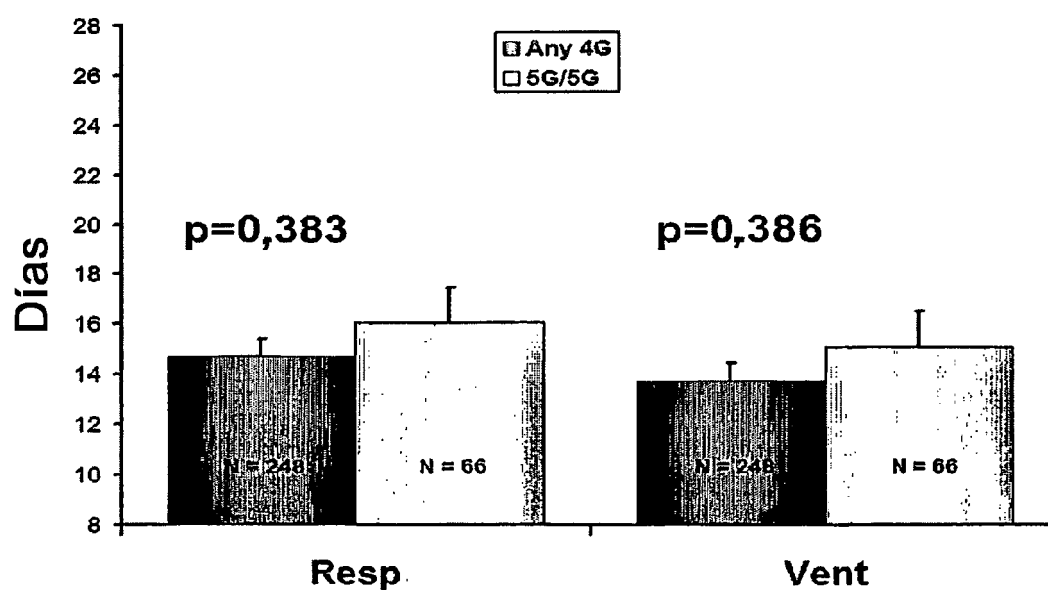


FIGURA 9A

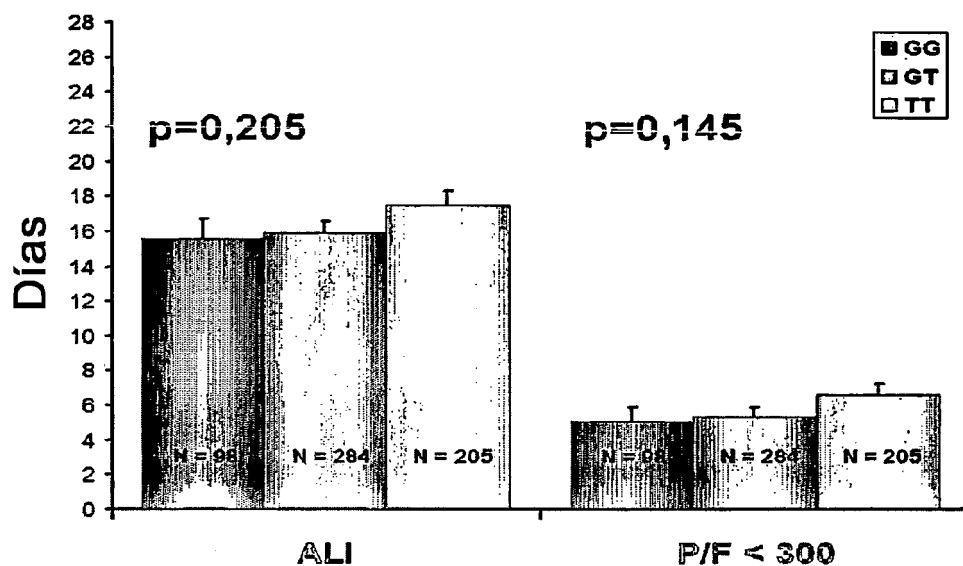


FIGURA 9B

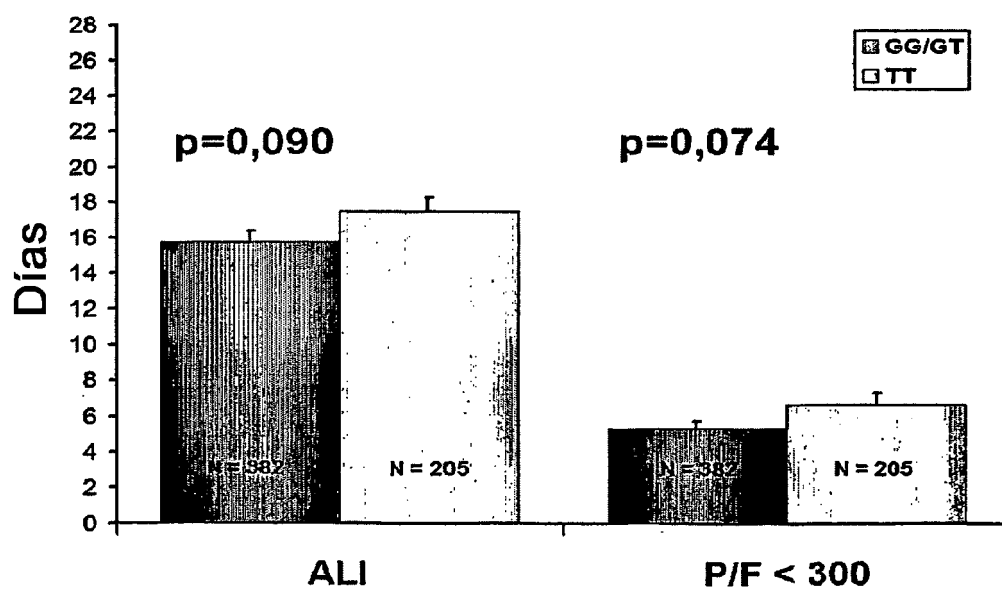


FIGURA 10A

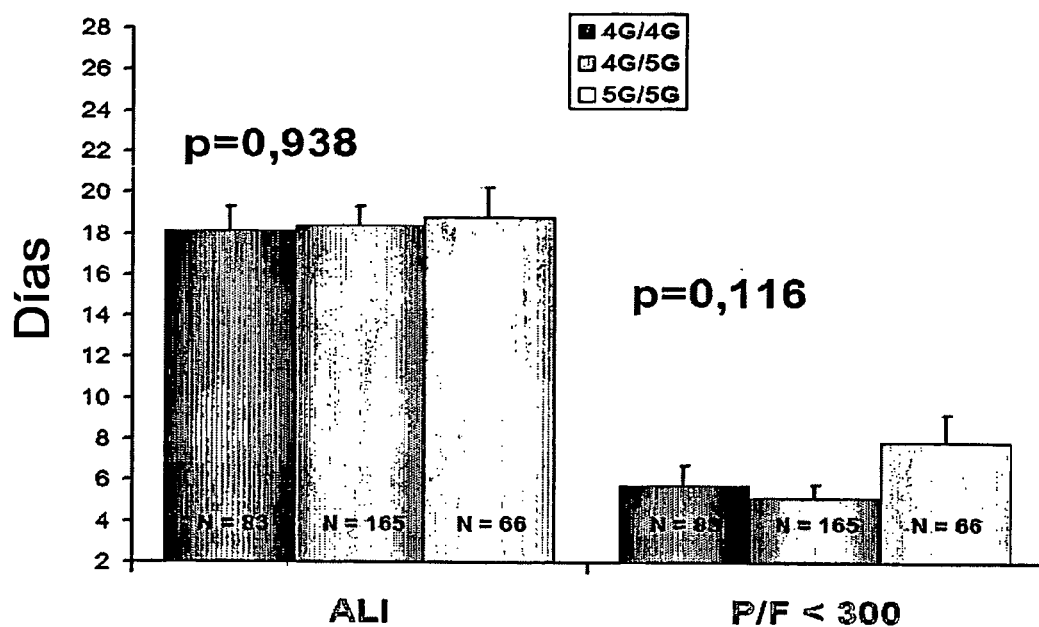


FIGURA 10B

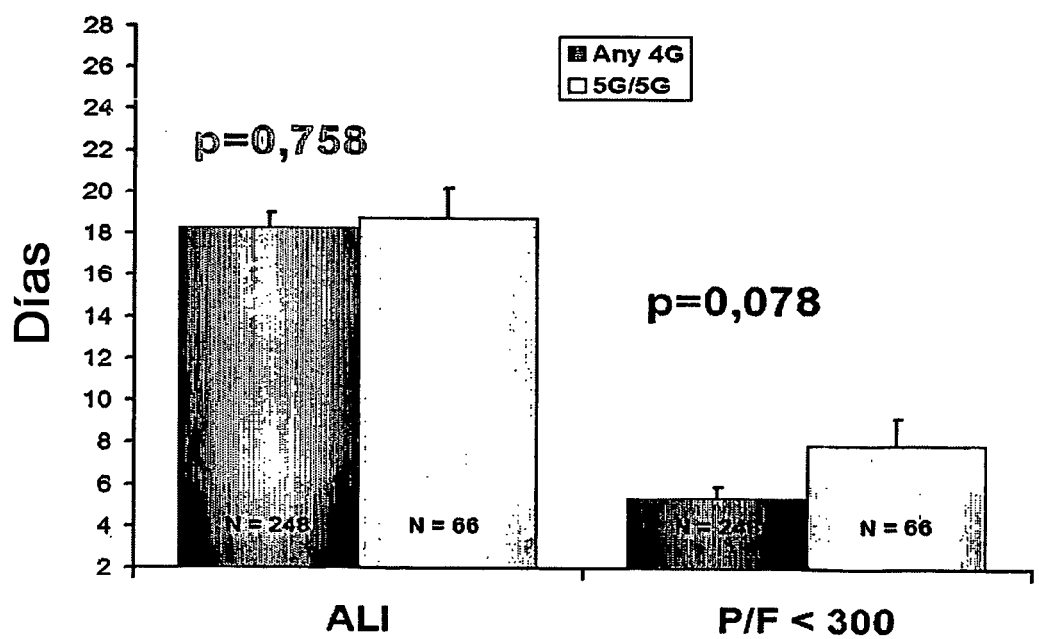


FIGURA 11A

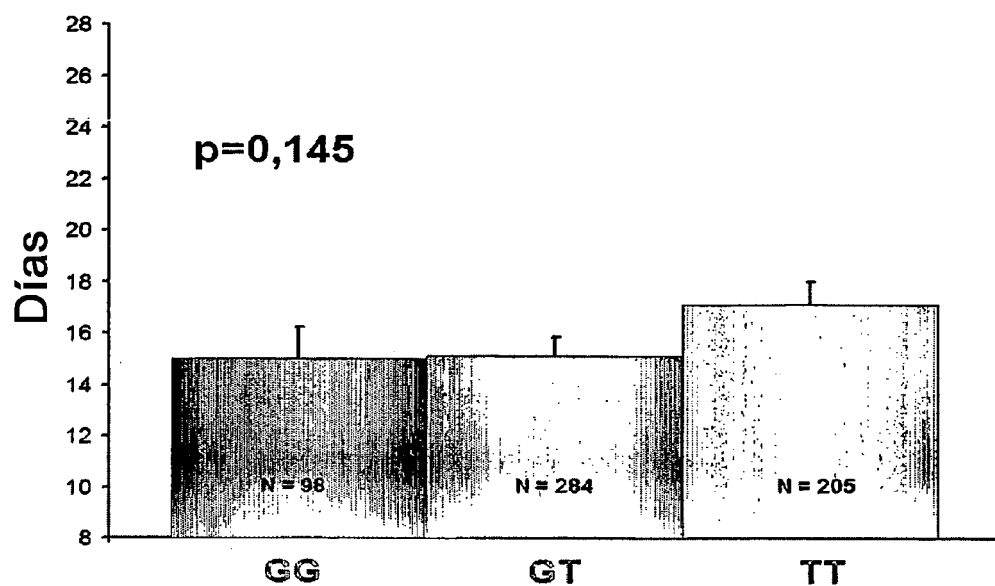


FIGURA 11B

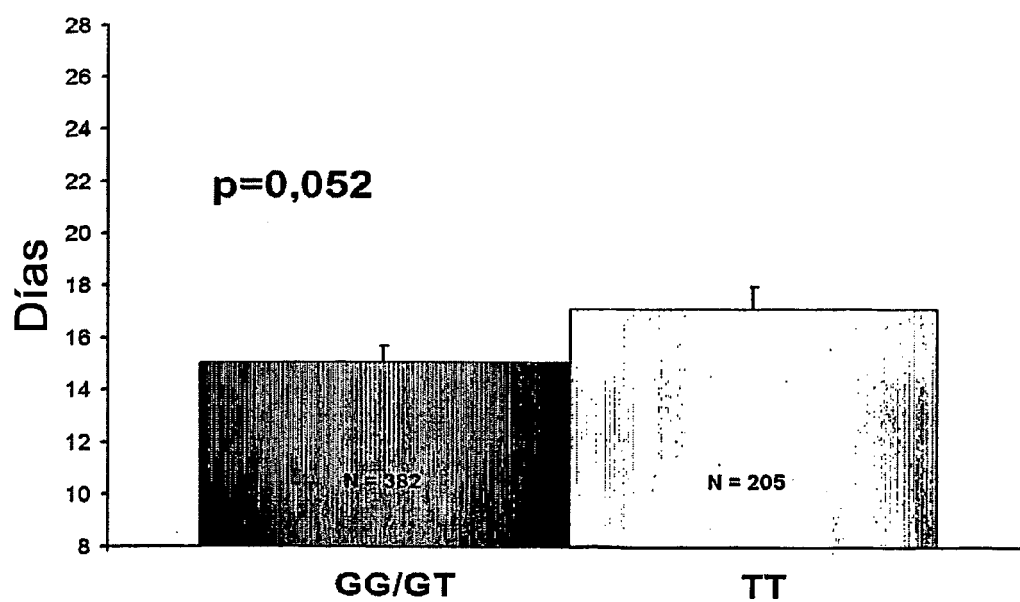


FIGURA 12A

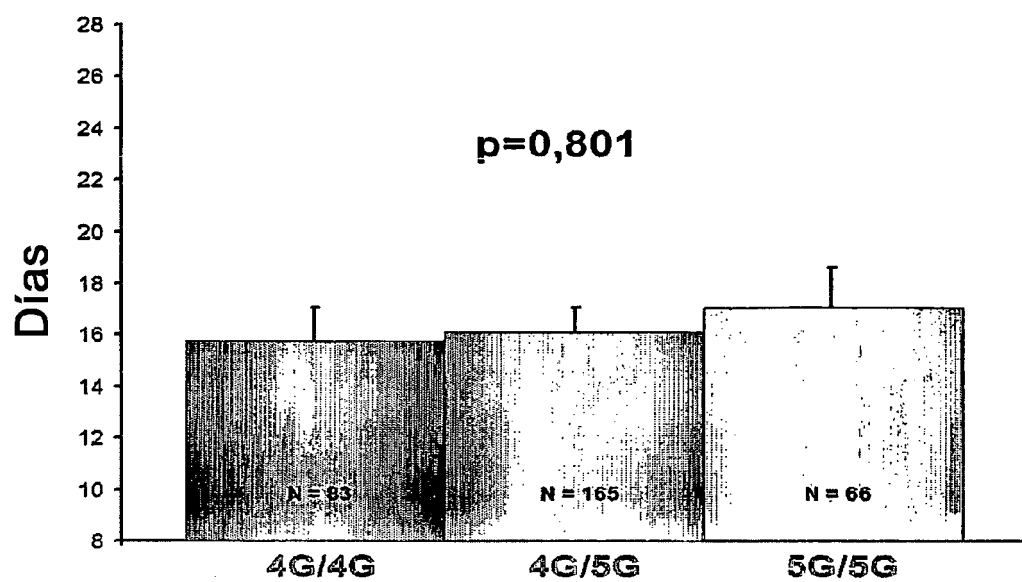


FIGURA 12B

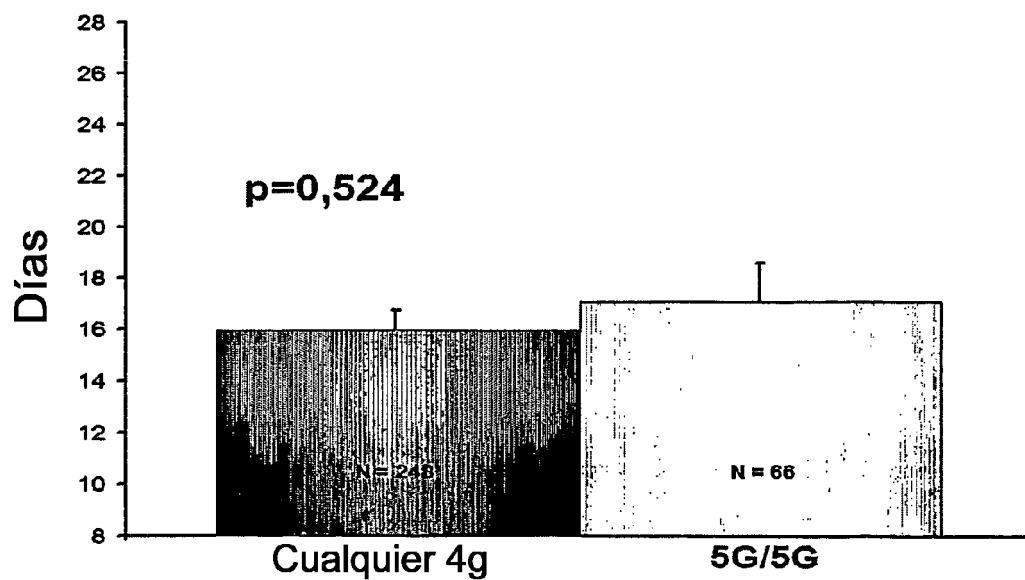


FIGURA 13A

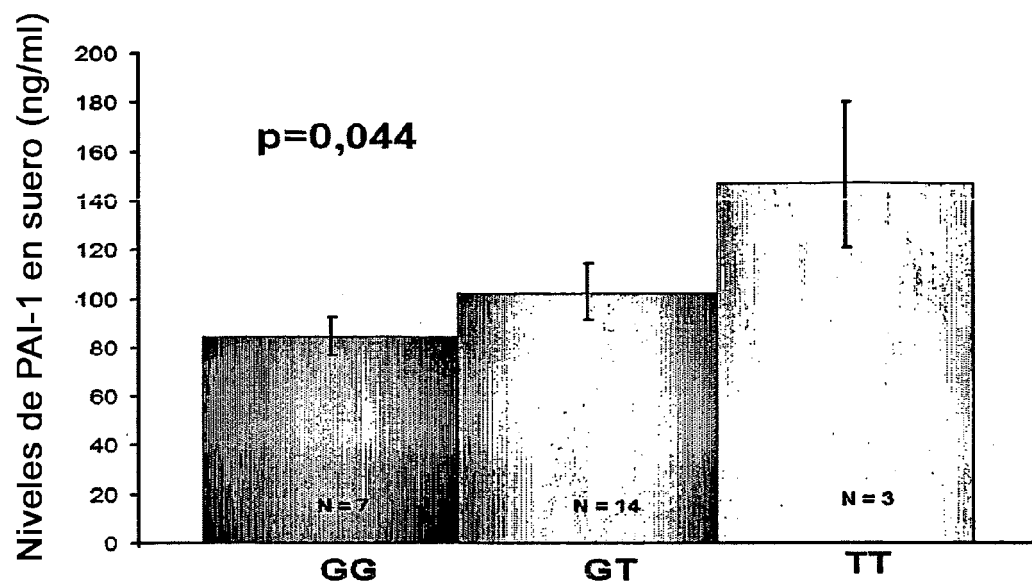


FIGURA 13B

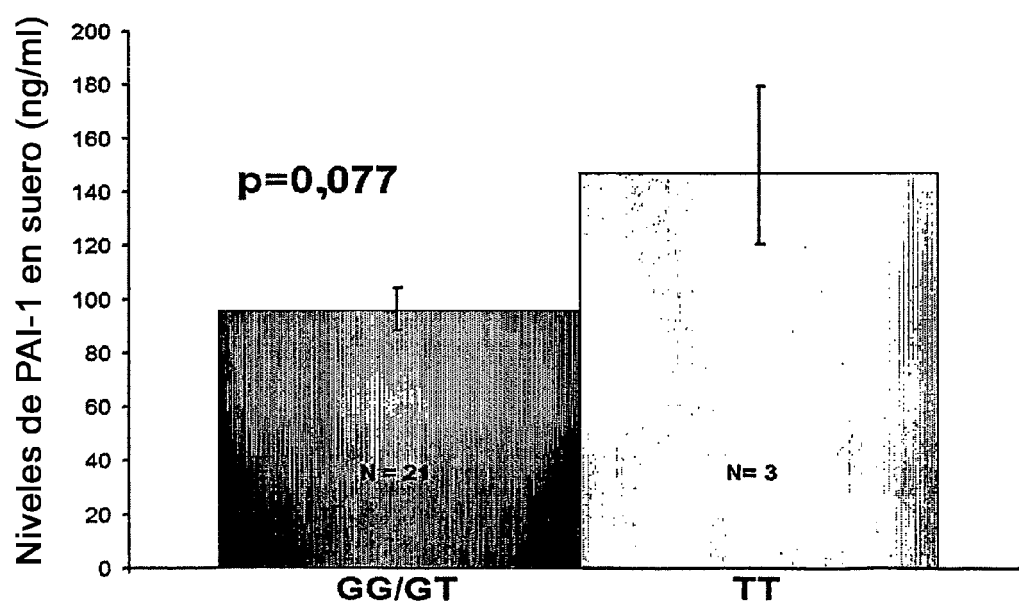


FIGURA 14A

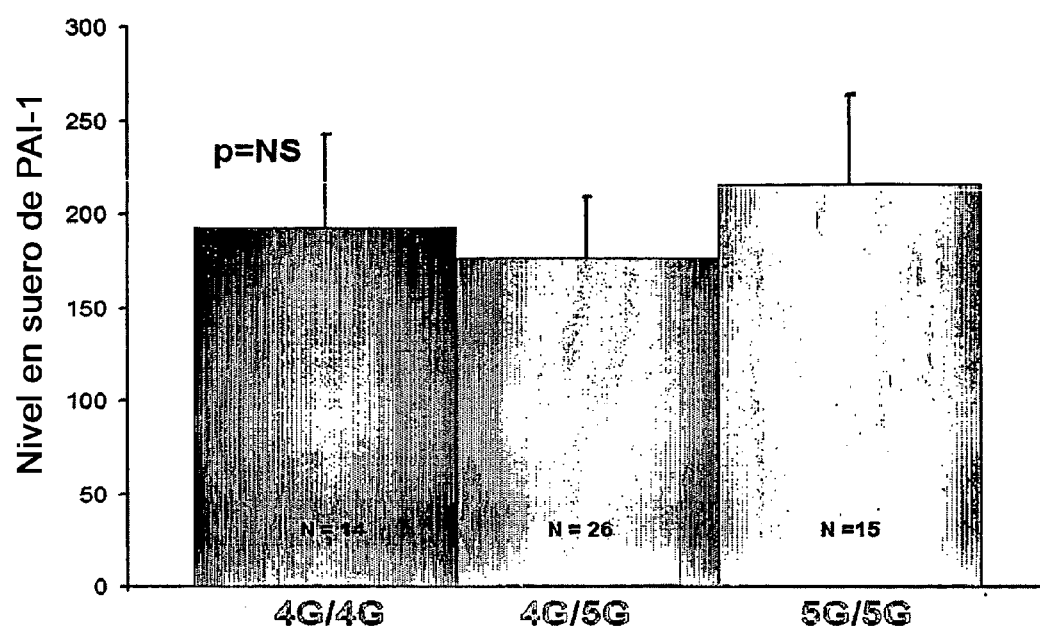


FIGURA 14B

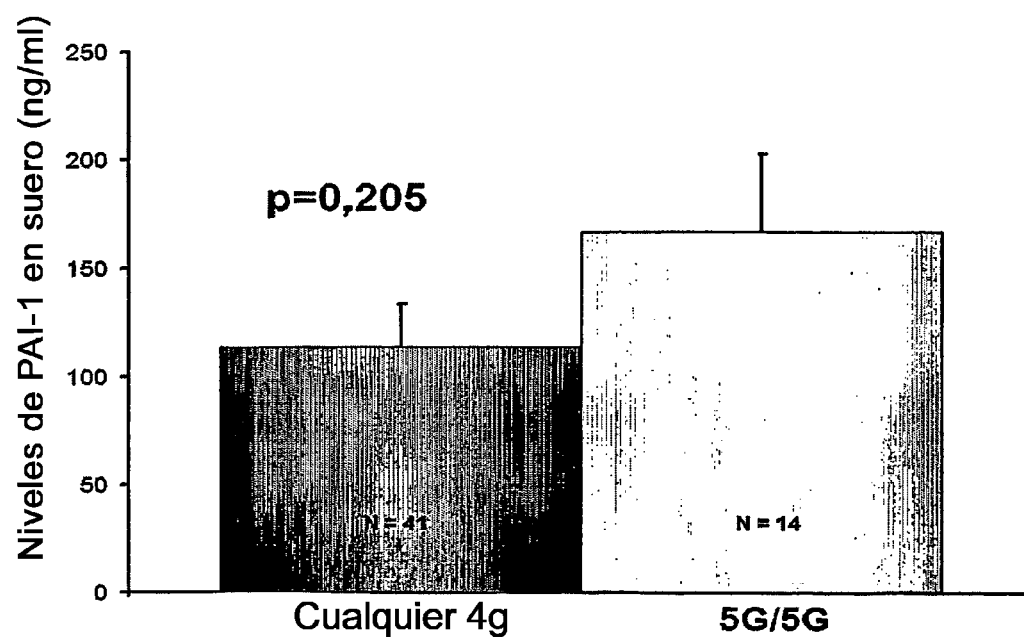


FIGURA 15A

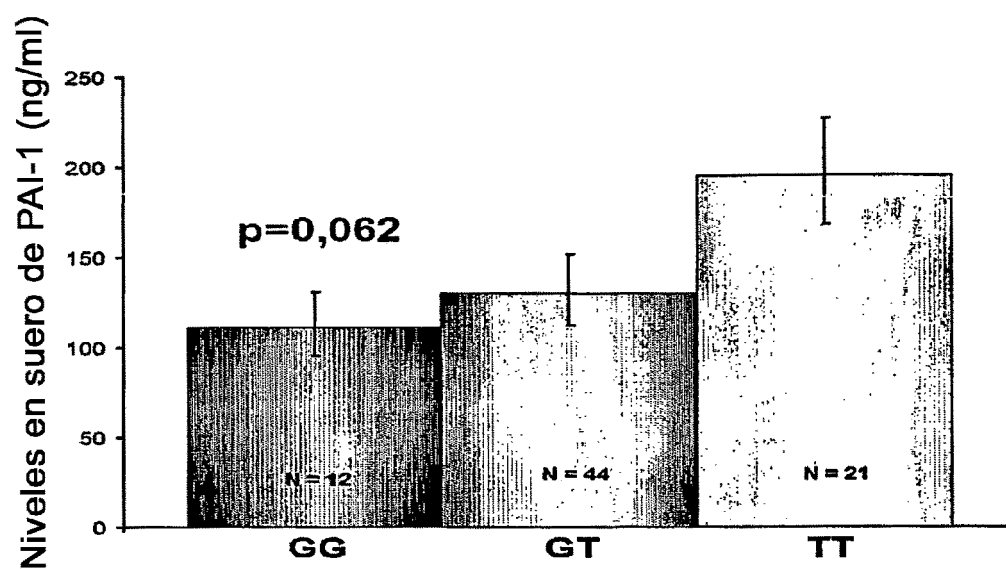


FIGURA 15B

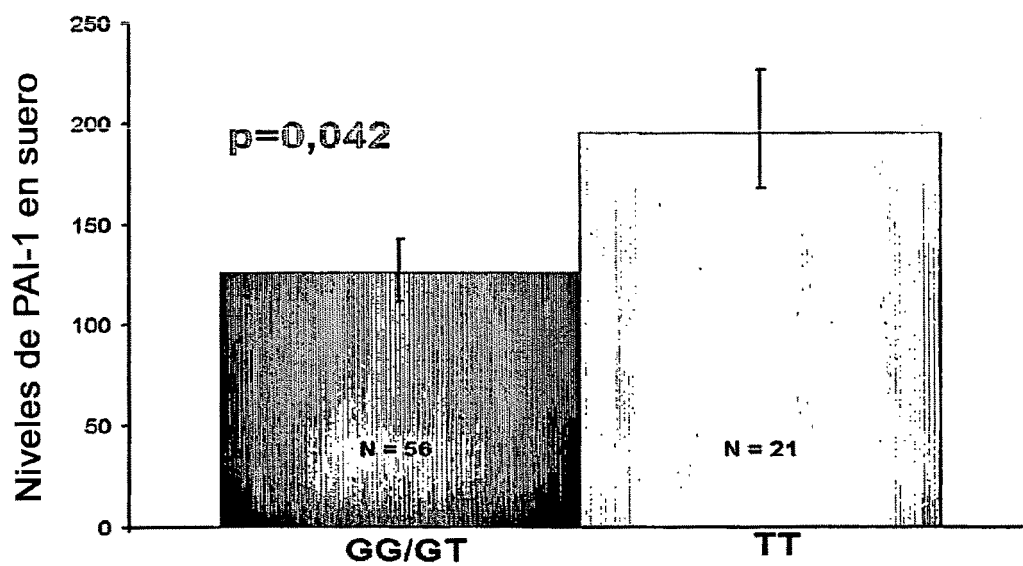


FIGURA 16

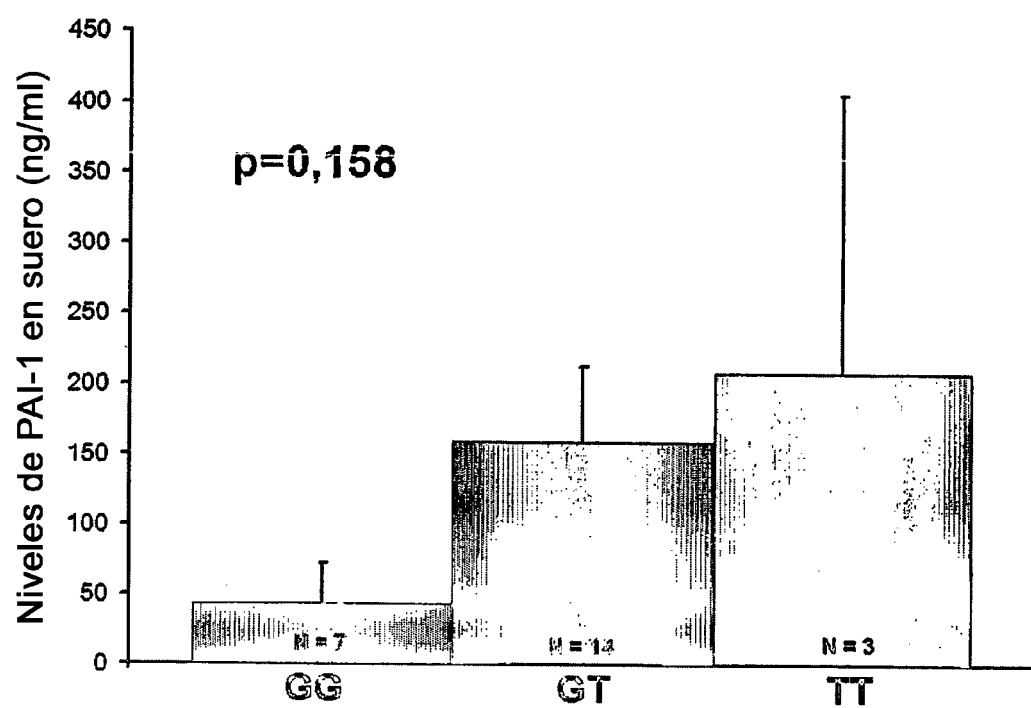


FIGURA 17A

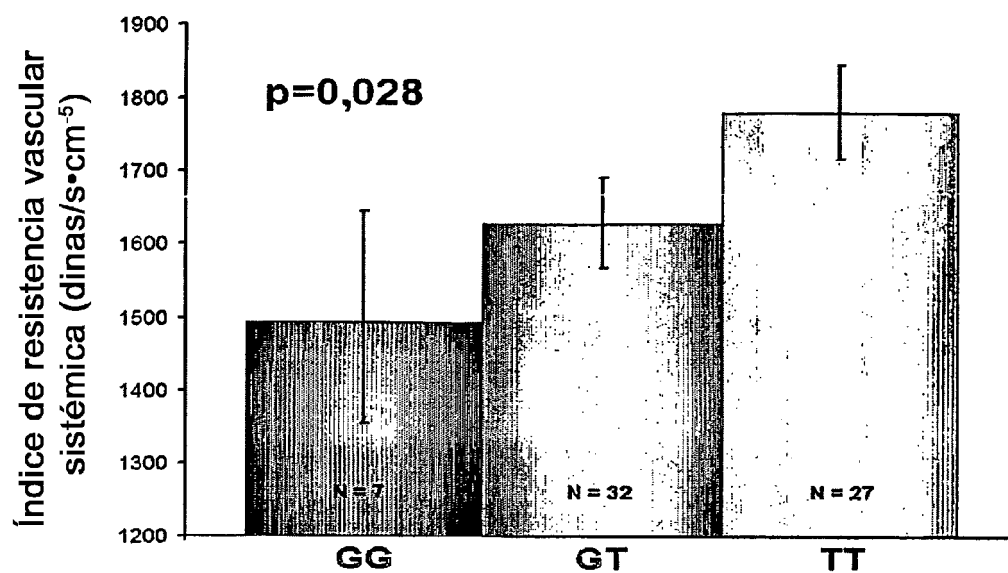


FIGURA 17B

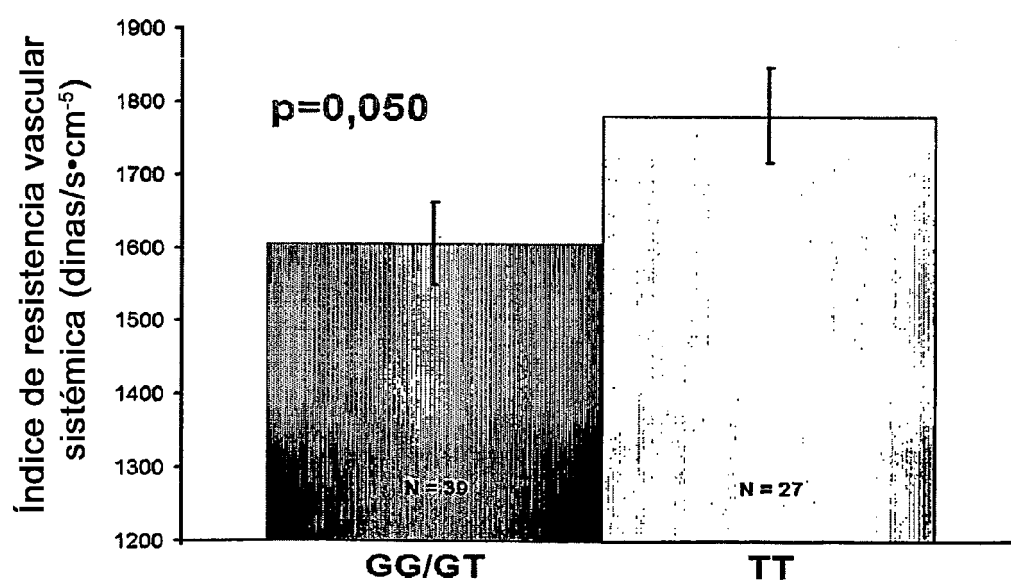


FIGURA 18A

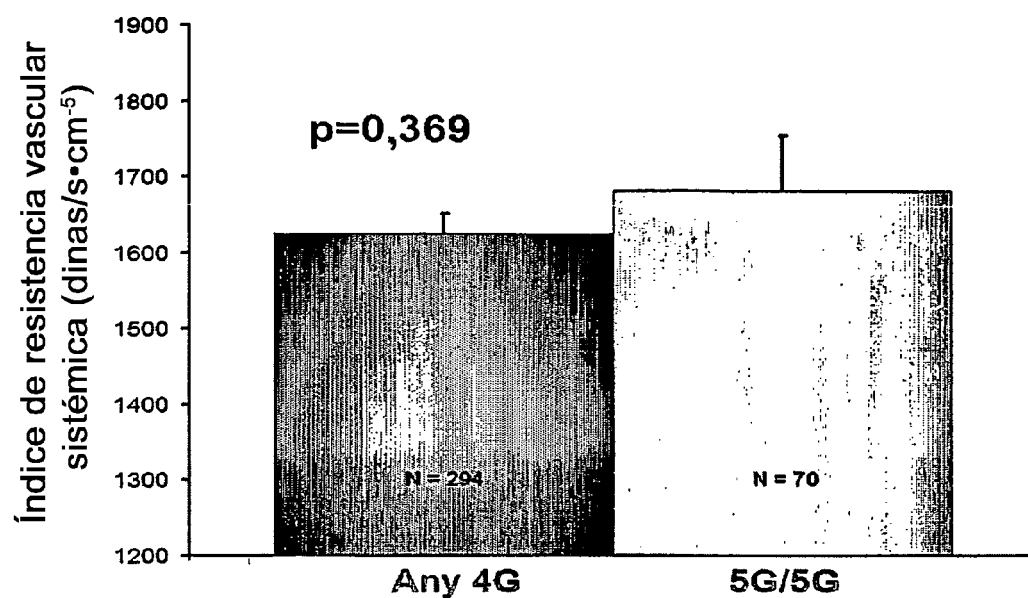
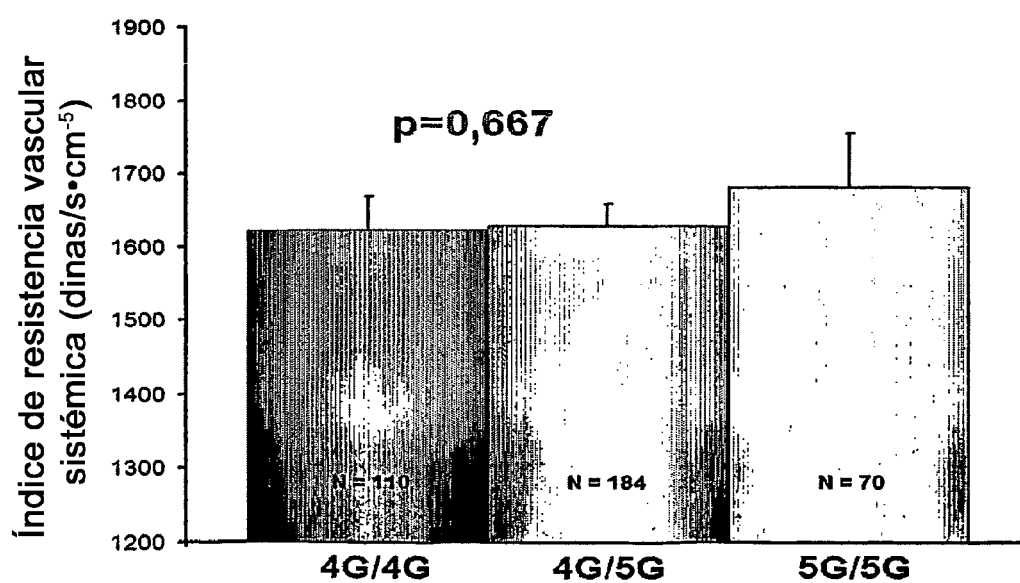


FIGURA 18B



ES 2 346 881 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> UNIVERSIDAD DE COLUMBIA BRITÁNICA	
	RUSSELL, James A.	
5	WALLEY, Keith R.	
	<120> HAPLOTIPOS DEL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO 1 (PAI-1) ÚTILES COMO	
	INDICADORES DE RESULTADO DEL PACIENTE	
	<130> 80021-638	
10	<140> TODAVÍA NO ESTÁ ASIGNADA	
	<141> 19-03-2004	
	<150> US 60/455.550	
15	<151> 19-03-2003	
	<160> 11	
	<170> PatentIn versión 3.2	
	<210> 1	
20	<211> 14544	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 1	
	cgtaactggctc catagcctgt taggaaccag gctgcataac aggaggtgag tggcaggtga 60	
	gtgaaatttc atctgtagtt acagccactc ctcactactc gcattaccac cagagctcca 120	
30	ctccctgtca gatcagcggc ggcattagat tctcatagga gctcgaacc tattctaaac 180	
	tgttcatgtg agggatctag gttgcaagct ccctatgaga atctaagcc tgatgatctg 240	
	tcacgggtctc ccatcacccc tagatgggac catctagttg caggaaaaca agctcagggc 300	
	tccactgat tctacacgat ggtgaattgt ggaattattt cattatata attacaatgt 360	
	aataataata gaaataaagc acacaataaa tgtaatgtgc ttgaatcatc ccgaaacat 420	
35	cccacccctg tctgtgaaaa aattgtcttc catgaaacca gtccctggtg ccaaaaacgt 480	
	tgaggaccac tgcctcacag aatctatcgg tcaactcttc tccctcacc cccttgcct 540	
	aaaagcacac cctgcaaacc tgccatgaat tgacactctg tttctatccc ttttccctt 600	
	gtgtctgtgt ctggagggaag aggataaagg acaagctgcc ccaagtccta gcgggcagct 660	
	cgaggaagtg aaacttacac gttggtctcc tgtttcctta ccaagctttt accatggtaa 720	
40	cccctggtcc cgttcagcca ccaccacccc acccagcaca cctccaacct cagccagaca 780	
	agggtgttga cacaagagag ccctcagggg cacagagaga gtctggacac gtgggggagt 840	
	cagccgtgta tcatcggagg cggccgggca catggcaggg atgagggaaa gaccaagagt 900	
	cctctgttgg gcccaagtcc tagacagaca aaacctagac aatcacgtgg ctggctgcat 960	
	gccctgtggc tgttgggctg ggcccaggag gaggggaggg cgctctttcc tggagggtgt 1020	
45	ccagagcacc gggtggacag ccctggggga aaacttccac gttttgatgg aggttatctt 1080	
	tgataactcc acagtgaact ggttcgccaa aggaaaagca ggcaacgtga gctgtttttt 1140	
	ttttctccaa gctgaacact aggggtccta ggctttttgg gtcacccggc atggcagaca 1200	
	gtcaacctgg caggacatcc gggagagaca gacacaggca gagggcagaa aggtcaaggg 1260	
	aggttctcag gccaaaggcta ttggggtttg ctcaattgtt cctgaatgct ctacacacg 1320	
50	tacacacaca gacgagcaca cacacacaca cacacacatg cctcagcaag tcccagagag 1380	
	ggagggtgtc agggggaccc gctggctgtt cacacggact ccagagacca gtgagtgggt 1440	
	ggggctggaa catgagttca tctatttcc tgcacatct ggtataaaa gaggcagtg 1500	
	cccacagagg agcacagctg tgtttggctg cagggccaag agcgtgtca agaagacca 1560	
	cacgcccccc tccagcagct gaattcctgc agctcagcag ccgcccagc agcaggacga 1620	
55	accgccaatc gcaaggcacc tctgagaact tcaggtagga gaaaagcaaa ctccctccaa 1680	
	cctcttactt cgggcttaag gcagagaact cgctcccca gaatctctc cctccatgat 1740	
	ccccgcctat tcctctatct tcttttcctc ggacctgcag ccttgggtcg accctgcctt 1800	
	aggggtgact gcaggagagc agggaggatg gtcaggcgct accaacaacc ccataccca 1860	
	gtaacaagaa ccttgactct ctcagtccct ctgcatcaag acacttacct atttccacc 1920	
60	tcatgcctgc taacttgaat gaaacaatcg ctgggaaagc attaagagaa ttaaggctgg 1980	
	gcactgtggc tcatgcctgt aatcccagca ctttgtgagg ctgaggcagg cagataactt 2040	

ES 2 346 881 T3

	gagcccagga	gtttgagacc	agcctgggca	acatggcaaa	accctgctct	ccccaaaaa	2100
	tacaaaaatt	agctgggctg	gctgggtgtc	ctgtattccc	agctacttgg	gaggctgagg	2160
	tgggaggatt	gcttcagctg	gggaggcgga	ggctgcaggg	agccaagact	gagccattgc	2220
5	acccagcctg	ggtgacagag	caagaccctg	tctctaaaaa	tgaatgaaag	gaaggaagaa	2280
	agagagagaa	agagagagag	gaaagaagga	aggaagtaaa	gaagaaagaa	agaaagaaag	2340
	aggaaagagg	aagaaagaaa	gaaaagaaa	aaaagaaaag	aaagcaaatt	taaagcttat	2400
	gcaaatcaaa	gatgttgtga	taattgataa	ttgagtctgg	gctaaattcc	ccctgggctg	2460
	caaaggcaga	gagtggtaat	gacttctcac	ctgcttttct	tctaaggctt	ttttacggga	2520
10	cacagaggga	agggagatgg	actggattcc	aagattccca	cagggcaaga	tgggcgaaga	2580
	ctccctgcca	ctgcccgggg	ataagtcagt	ctgagtgaag	cggagtggga	tgggcttaga	2640
	acctgaacat	gtcatggtct	cttcctgcac	cttgccctag	tgttcactta	ccacctgctt	2700
	gcaggaaaca	agaagagcag	ggqccacagc	tggccagctc	ccctcccttc	ccgctgtctt	2760
	tccagaacga	ttccttcacc	agccctcttt	ccattgctct	aggatgcaga	tgtctccagc	2820
15	cctcacctgc	ctagtctctg	gcctggccct	tgtcttttgg	gaagggctct	ctgtgacca	2880
	tcccccatcc	tacgtggccc	acctggcctc	agacttcggg	gtgaggggtg	ttcagcaggt	2940
	ggcgagggcc	tccaaggacc	gcaacgtggg	tttctcacc	tatgggggtg	cctcggtgtt	3000
	ggccatgctc	cagctgacaa	caggaggaga	aaccagcag	cagattcaag	cagctatggg	3060
	attcaagatt	gatggtgagc	caaggagcac	caggggaggt	gggtggcatg	cagaacagac	3120
20	ctaccagaag	ccaaggaaag	gctggctctg	gcttagccga	gccaagcccc	atacagctgt	3180
	gctgcagggg	ccaccccatc	ttcttcccac	tacactccaa	gtcactggac	ccttgaatct	3240
	ccaaggggtg	ctgaccagta	gatttaccgc	ttattcacca	ccgtgtgatc	ttaacctcgt	3300
	taagtttgcc	catctacaaa	atgaggatta	tttgctgtcc	taaagaattc	atgagccggg	3360
	cgcgttggtc	caaagcctg	taatcccag	actttgggag	gccaaggcgg	gcggtatcat	3420
25	aggtcaggag	atcaagacca	tactggctaa	cacagtgaag	ctccatctct	actaaaaata	3480
	caaaaaaat	tagccaggcg	tgggtggcag	cgctgtagt	cccagctact	cgggaggctg	3540
	aggcaggaga	atggcatgaa	cccaggaggc	agagcttgca	gtgagctgag	atcgtgccac	3600
	tgcactccag	cctgggcgac	agagagagac	tccgtctcaa	aaaaaaaaat	taaaagaatt	3660
	catggaatta	cacttgtgaa	atacttagca	tagccatcac	tataggaaaa	aaatctaagg	3720
	ccaggcacag	tgcctcatgc	ctgtaatctc	agcaatttcg	gagtttgagg	caggaggatc	3780
30	acccaaggct	aggagtcca	ggcagcctg	ggcaatacgg	tgaaccccg	tctctaataa	3840
	aaatataaaa	attagtctga	tgaggtggtg	cacctgtaat	cccagctact	caggaaagctg	3900
	agacacaaga	atcactttaa	cccgggaggt	ggaggtggca	gtgagctgag	atcacaccat	3960
	tgcactccag	cctgggtgac	agagtggagc	ctgtcaaaaa	aaagaaaaga	aagagagaga	4020
35	gagagagaag	agagagaaa	aaagaagaag	aaagaaaaga	agagagagag	agaaagaaag	4080
	aaagaacaaa	agaaacaaa	aaagaaagga	aaagaaaaaa	aaaactaagg	ccaggcaagg	4140
	tggcttatga	ctgtaatttc	agcactttgg	aagattgagg	caggaggatc	acttgaggcc	4200
	agaagttcga	gacaagactg	agcaaccagg	agacccctgc	ctctacaaaa	aaatttacia	4260
	attagccaga	tgtggtgaca	catacctgta	gtcccaacta	ctcaggaggc	tgaggtggga	4320
40	ggatggcttg	agcccaggag	ctggaggctg	cagtggagta	tgattgtacc	actgcacttc	4380
	agcctgggca	acaaagggaa	gcectgtctg	aaaaaaaaaa	aaaaagaaaa	agaagaagaa	4440
	agaaaatatt	tagggttcat	ccaggaggca	gaggttgag	taagctgaca	tcgcgccatt	4500
	gcactccagc	ctgggagaca	agagcaaaac	tccaactcaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	4560
	caggaagaaa	atatattagg	ttcataactt	agaacagag	aaaaatattc	tagcccaaag	4620
45	aaagggttgg	gatctgagac	ttttgaagaa	aggaaggaga	tacagaaaag	agatttcac	4680
	ctggaatgaa	atctccctcc	agagagccct	gggaaagcac	ggtagccccc	atccatcaga	4740
	gtggagcccc	ttgtggggga	agtgggctcg	gctgggaacc	ctcaattcag	cataagcctc	4800
	acatgtcctc	tcctctctgt	cccggtgcag	acaagggcat	ggcccccgcc	ctccggcatc	4860
	tgtacaagga	gctcatgggg	ccatggaaca	aggatgagat	cagcaccaca	gacgcatctt	4920
50	tcgtccagcg	ggatctgaag	ctggtccagg	gcttcatgcc	ccacttcttc	aggctgttcc	4980
	ggagcacggg	caagcaagtg	gacttttcag	aggtggagag	agccagattc	atcatcaatg	5040
	actgggtgaa	gacacacaca	aaaggtgagc	aggcagggaa	aggaaaacca	tttcttgggc	5100
	ctcaagagaa	agggaatttg	gaaataaatc	cacatatccc	agttgggtgc	agtagttcac	5160
	acctgtaatc	ccagcccaac	actttgggag	gtctaggcga	gaggaaggct	tgaggcctgg	5220
55	agtttgagac	cagcctggcc	aacataacaa	gacctcatct	cttcaaaaaa	tttaaaaacc	5280
	agccgggcat	ggtggtgcac	acctgtagtc	ccagctactt	gggaggctga	ggtgggagga	5340
	tcacttgagt	ccagcagttc	aaggctgcag	tgagctatgt	ttgcaccacc	acactccagc	5400
	ctagtcaca	gaacaagacc	tcactctcaa	aaaacaaaca	aaaaccaaata	ccacatatcc	5460
	taaaaaatgc	tccttttcag	cattctcttc	tcctatggaa	aagggttgga	tgctttaaga	5520
60	accaaattct	aggctgggca	cggtgggtca	cgctctaat	cctagcaact	tgagaggcca	5580
	aggcgggcag	attgcctgag	cacaggagtt	cgagaccagc	ctggccaaca	tggtgaaacc	5640
	ctgtctctgt	caaaaataca	aaaaattagc	caggtgtgtt	ggcgctgccc	tataatccca	5700

ES 2 346 881 T3

	gctgctcggg	aggatgaggt	tcaaagaatc	acttgaaccc	gggaggcaga	ggctgcagtg	5760
	agctgagatc	atgccactgc	actccagcct	gggtgacaga	gcaagacttt	gtctccaaaa	5820
	aaaggaacta	gacgggttca	tttaaacccc	tgactgcagc	cctttgacat	acatccaatt	5880
5	gaggactggg	gactccggga	aacatctaaa	aggcttaaaa	actttgtcta	acttcagecg	5940
	ggcatggtgg	ctcacacctg	taatcccagc	actttgggag	gctgaggcag	gtggatcaca	6000
	aggtcaggag	tttgagacga	gcctgaccaa	catggtgaaa	ccccgtctct	actaaaaata	6060
	caaaaattag	ccaggcatgg	tggcaggcgc	ctgtaatccc	agctattcgg	gaggctgagg	6120
	caggagaatt	gcttgaaccc	cggagacaga	ggttgcagcg	agccgagatc	gcgcacactgc	6180
10	actccagcct	ggcaatagag	tgagactcca	tctcaaaaaca	acaacaacaa	caacaacaac	6240
	aacaaaatcg	tctaacttcc	tgatcttcc	gatcattgat	tttcccatag	gtatgatcag	6300
	caacttgctt	gggaaaggag	ccgtggacca	cctgacacgg	ctgggtgctgg	tgaatgccct	6360
	ctacttcaac	ggccactgga	agactccctt	cccgcactcc	agcacccacc	gccgcctctt	6420
	ccacaaatca	gacggcgagca	ctgtctctgt	gcccactgatg	gctcagacca	acaagttcaa	6480
15	ctatagtaag	tccaagagcc	ccttccccac	agcccacagc	aaactgcatct	cattcctggg	6540
	gtctcccaag	gaatacccaa	aatgtcacc	tctgaggggag	gaagaccaca	gggaatgctc	6600
	ccctttaagg	gaggagagac	cctagaatat	actccagctt	tgacaaagat	ttcccaagca	6660
	ggagacatca	ggataatggg	aacagaagac	aggaggttta	tcccatgaag	gatgaagaag	6720
	ctgaaatcca	gagattccct	cagggccaca	tttgtccacc	tgactccagg	gtctcatctt	6780
20	cgtgtgttgc	tagtgtgatt	acctggggat	gagaaatcct	gctgggggag	ttgagggttaa	6840
	gaggtagtgg	actccagggtg	ctgtggctca	cgcctgtaat	cccagcactt	tggggaggcca	6900
	aggcagggtg	atcaggaggtt	tgaggtcagg	agtttgagac	cagcctggcc	aacatggtga	6960
	aaccctgtct	ctactaaaaa	tgcaaaaatt	agccaggtgt	ggtggcaggc	gcctgtaatc	7020
	ccagctactc	gggaggctga	ggcaggagaa	tcacttgagc	ccgggagggtg	gagggtgcag	7080
25	tgagccgaac	gaaattgagc	cacttcaccc	cagcctgggc	aaaagagtga	aattocattc	7140
	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaggatgagg	actgggatga	actggtggct	gggtgtgggg	7200
	aaaatggaag	tgaagggaag	ccaaaagaga	cagagaaggc	ctggcgcgcc	gactcacgcc	7260
	tataatccca	gcactttggg	aggctgagaa	gggggattgc	ttgaggccag	aagttgaata	7320
	ccagtctggg	cagcatagca	agaccctgcc	tctacaaaaa	aaaaattttt	tttaatttagc	7380
30	caggcttggg	gacatgcac	tgtagtctac	tcaagaagct	gaggtgaggc	caggcacggg	7440
	ggctcacgcc	tgtattccca	gcactttggg	aggtaaggc	gggtggatga	cctgagggtca	7500
	ggagttcaag	accagcctgg	ccaacatggt	gaaaccccat	ctgtataaaa	atacaaaaat	7560
	tagctgggca	tgatagcagg	tgccgtgta	tccagctact	caggaggctg	agggtgggaga	7620
	aaatgttgaa	cccgggaggg	ggaggttgca	gtgagccgag	atcatgccat	tgactccag	7680
35	cctgggcgac	agagtgcagc	tccttctcaa	aacaaacaaa	caaacaacaa	aacaaaatac	7740
	agaagctgag	gcgggaggaa	catttgaacc	ggattcggag	gctgcagtga	gctatgattg	7800
	caccactgcg	ctccagtctg	tgtgacagt	agaccctgtc	tcttacacac	acacacacac	7860
	acacacacac	acatgcacac	acacagagag	agagaaatta	gaagatactg	aattggcaga	7920
40	agagaaggga	aatagaaatt	aaaatactga	ataggggagc	agtgaacagg	ggatacccaa	7980
	aagccaagag	cagagagagag	cctggcttcc	agaaatagtg	gagaagccag	gagaactagg	8040
	tgaaaaccca	gtgctggggt	gccatcagcg	agagctggag	ccatttccaa	cgaacctatc	8100
	tgtcgtcttc	acagctgagt	tcaccacgcc	cgatggccat	tactacgaca	tcctggaact	8160
	gcctaccac	ggggacaccc	tcagcatggt	cattgctgcc	cottatgaaa	aagaggtgcc	8220
45	tctctctgcc	ctcaaccaaca	ttctgagtgc	ccagctcatc	agccactgga	aaggcaacat	8280
	gaccaggctg	ccccgcctcc	tggttctgcc	caagtaagcc	accccgctat	ctccccgacc	8340
	taccaacccc	tctctcctgg	ctccctaaag	tcaccgcccc	caggttgaat	ttcccagatc	8400
	tgtgatgctt	gcaggacatg	catgtgtggg	aggctgatgg	gaaactgtgg	cctggggttg	8460
	attatgagtc	ttgcaatcat	ccctccccc	gtttctgctg	gagggcaggg	gacagctctt	8520
50	cctgaccaca	ccccacatt	gactatcccc	agaataccba	gcaaaagccc	ccaaaaggag	8580
	agtcagagaa	atgaggggag	tgggggcccc	atcagctcac	atctacttag	ggtcgcccc	8640
	tcagcacttc	catccccaac	cctttcaagt	caacatccaa	acaaaagaaa	tcacttccaa	8700
	ggacggagca	gctcaaagcg	cagcttctag	ctggggttcc	aagaaagcag	atttttcgaa	8760
	atccttctgc	agaagggaagc	aaagagattt	tttgaaatct	ttctgcagaa	ggagaaggct	8820
55	ggagctgggg	aactccagaa	ttatagggaa	gcctcccacc	acgctcatcc	caaatttccg	8880
	gatgctataa	tgccaggctt	ggggaaagag	gagaatttag	ttgggttagct	ggtgcgtgct	8940
	ctcacttgca	tcctctctct	ttctctctct	tttttttctc	ctctctctct	ggctcataaa	9000
	aatggaggta	attagttgtg	ccctgggtgag	aagcagagag	tgacaaaagg	ccccctgctt	9060
	gagtcctctt	cagggttagc	tctcagaaac	acaatctgca	gaacagattt	ttgttccaac	9120
60	atccttgag	gagaatttgc	ccttagcttc	ccccacccca	gccaggctga	ataaaattat	9180
	gctgaaacta	ctgtcttatt	tgaggaaagt	aattagtcat	agggtgggag	gggtggggag	9240
	attgcagaag	aatgttcatg	aatattagga	ttttcagctc	taagggggga	ctttgtaaac	9300
	agcttttagaa	gaagaaccag	gccggctggg	tgtggtggct	catgcctgta	atctcagcat	9360

ES 2 346 881 T3

	ttggggagggc	caaggcggggc	ggatcaacttg	aggtcaggag	tttgagacca	gcctggccaa	9420
	catggtgaaa	ccctgtctct	attaaaaata	caaaaattag	ccagccgtgg	tagcgagcgc	9480
	ctatgatccc	agctactccg	gaggctgagg	ccagagaatc	acatgaacct	gggaggtgga	9540
5	ggctgcagtg	agccgagatc	acgccactgc	actccagcct	gggggacaga	gcaagaatct	9600
	gtttcaaaaa	aaaaaaaaaga	aaaataggaa	ggaagggaag	aaaggaaagg	aaagaagaga	9660
	gagagaaaga	aagagagaga	gagagagaga	aagaaagaaa	gaaagaaaga	aagaaagaaa	9720
	gaaagaaaga	aagaaagaaa	gaaaaagaaa	ggaaagaaaag	aacgaacgaa	ccaggcctcc	9780
	ctctccaacc	ttcacctccg	tccctattct	ggccacttga	ttcggggggac	acctggtagg	9840
10	ggatggggaa	aggtggggagc	tgccagccag	aggggacccc	ggcttgagca	gcctcttgct	9900
	gctatctgca	ggttctccct	ggagactgaa	gtcgacctca	ggaagccct	agagaacctg	9960
	ggaatgaccg	acatgttcag	acagtttcag	gctgacttca	cgagtctttc	aggtaaagaag	10020
	actttccttt	gcattttctc	acqccagtg	actgcggggg	cccctaagag	gaaaaaggaa	10080
	cctctccttg	agagcggcag	ctgatctaata	cctgtatcca	catctgtttc	agaccaagag	10140
15	cctctccaag	tcgcgcaggc	gctgcagaaa	gtgaagatcg	aggtgaacga	gagtggcacg	10200
	gtggcctcct	catccacagg	tgagtctggc	tcaggtgagg	ctccacgggt	gtcgctcca	10260
	tcgcccctca	gataaactgg	tccccagacc	cggaaaggac	cccgcagccc	tctcggcaca	10320
	gagcagctct	gtctgtgctc	agccatcacc	cactccccac	ctgtttctca	gcctggaaaa	10380
	cgggcttg	acccatggaa	cctgtttcct	cgctgatgg	ctcctaagtt	ccctgactgt	10440
20	gaaaaaggcct	cctaaagaaa	aacccaagtt	gttcccacag	tggaagtaa	acttaagaaa	10500
	catgcttata	aggctgggca	tggtggctcc	cacctgtaata	cccagcgctt	tgggggacca	10560
	aggcaggtgg	atcacttgag	gtcaggaatt	cgagaccagc	ctgggcaaca	tgccaaaacc	10620
	ctatctctac	taaaaaataca	aaaattaggc	aggcgtggtg	gcatgtgcct	gtagtcccag	10680
	ctacttggga	ggctgaggca	ggagaatcac	tgaattccag	gaggcagagg	ttgcagttag	10740
25	ccgagatcac	gctgctgcac	tccagcctgg	gcaatagagc	atgactctga	agaaaaagaa	10800
	gaaagaaaga	gagagagaga	gaaaaagaaag	aaagaaagaa	agaaagaaag	aaagaaagaa	10860
	agaaagaaag	aaagaaagaa	agagaaagaa	agagaagaaa	agaaagaaa	gagcttatca	10920
	ataagccctt	aaaggattta	gataaatgtg	tgtaaggga	gagctgatcc	attgtacca	10980
	agctcctgga	ggaaccagg	tctcagagga	tgccctaaa	cttttaaggt	tcatattcag	11040
30	gaaaacaaac	aactccagc	tgggcttagt	ggctcacacc	tgtaatccca	gcactttggg	11100
	aggccgaggc	aggagatcg	cttgagccca	ggaatttgag	accagcctgg	gcaatataat	11160
	gagactgtgc	tctacaaaaa	ttagaaaaaa	attagccagg	catgggtgga	tgcaacctga	11220
	gccccagtta	cttgggagac	tgaggtggga	ggatcaactg	agcccatgag	ttcaaggctg	11280
	cagttagcca	tgaaggtgcc	actgcactcc	cgctgggag	acagagggag	accctgtctc	11340
35	taagaaaaac	ggcgggggtg	ggggtggtgc	cagtgccagc	atccctctgt	tctaagacat	11400
	tgtcccttct	cttgccagctg	tcatagtctc	agcccgcatg	gcccccgagg	agatcatcat	11460
	ggacagacc	tctctctttg	tggtccggca	caacccca	ggtgagcctg	gaacccatca	11520
	cgttccacat	cctccacccc	attctttctc	tcaggaaacta	gtcccgacag	atgcagacat	11580
	ccctctatcc	ctgagagggc	tctgggcagg	gaaccataac	cctaccctgc	ttctgtccc	11640
40	aagaggaggc	taccttctat	cacccacaga	cagtgcgggg	tccccgctct	gtgactcagg	11700
	cagctgcgac	tccagacagc	tcaactcatct	gcctagatct	cagtccctcc	accacatcc	11760
	agcctgatga	gctgtcccac	tccttctgct	tctcaacccc	catgggtctt	ccaccctcag	11820
	gaacagtcct	tttcatgggc	caagtgatgg	aaccctgacc	ctggggaaaag	acgccttcat	11880
	ctgggacaaa	actggagatg	catcgggaaa	gaagaaactc	cgaagaaaag	aattttagtg	11940
45	ttaatgactc	tttctgaagg	aagagaagac	atttgccctt	tgtaaaaaga	tggtaaacca	12000
	gatctgtctc	caagaccttg	gcctctcctt	ggaggacctt	taggtcaaac	tccttagtct	12060
	ccacctgaga	ccctgggaga	gaagtttgaa	gcacaactcc	cttaaggtct	ccaaaccaga	12120
	cggtagcgcc	tgccgggacca	tctggggcac	ctgcttccac	ccgtctctct	gcccactcgg	12180
	gtctgcagac	ctggttccca	ctgaggccct	ttgcaggatg	gaactacggg	gcttacagga	12240
50	gcttttgtgt	gcctggtaga	aactatttct	gttccagtc	cattgccatc	actottgtac	12300
	tgcttgccac	cgcggaggag	cgtggtgaca	ggccaaaggc	cagtgggaaga	aacacccttt	12360
	catctcagag	tccactgtgg	cactggccac	ccctccccag	tacaggggtg	ctgcagggtg	12420
	cagagtgaat	gtcccccatc	atgtggccca	actctcctgg	cctggccatc	tccttcccca	12480
	gaaacagtg	gcatgggtta	ttttggagtg	taggtgactt	gtttactcat	tgaagcagat	12540
55	ttctgcttcc	ttttattttt	ataggaaatag	aggaagaaat	gtcagatgcg	tgcccagctc	12600
	ttcaccccc	aatctcttgg	tggggagggg	tgtacctaaa	tatttatcat	atccttgccc	12660
	ttgagtgtct	gttagagaga	aagagaacta	ctaaggaaaa	taatattatt	taaactogct	12720
	cctagtgttt	ctttgtggtc	tgtgtcaccg	tatctcagga	agtcagcca	cttgactggc	12780
	acacacccct	ccggacatcc	agcgtgacgg	agccacact	gccaccttgt	ggccgctga	12840
60	gacccctcgg	ccccccgggc	ccccccgggc	cctctttttc	cccttgatgg	aaattgacca	12900
	tacaatttca	tctccttca	ggggatcaaa	aggacggagt	ggggggacag	agactcagat	12960
	gaggacagag	tggtttccaa	tgtgttcaat	agatttagga	gcagaaatgc	aaggggctgc	13020

ES 2 346 881 T3

	atgacctacc	aggacagaac	tttccccaat	tacaggggtga	ctcacagccg	cattgggtgac	13080
	tcacttccaat	gtgtcatttc	cggctgctgt	gtgtgagcag	tggacacgtg	aggggggggg	13140
	tgggtgagag	agacaggcag	ctcggattca	actaccttag	ataatatttc	tgaaaaccta	13200
5	ccagccagag	ggtagggcac	aaagatggat	gtaatgcact	ttgggaggcc	aaggcgggag	13260
	gattgcttga	gccaggaggt	tcaagaccag	cctgggcaac	ataccaagac	ccccgtctct	13320
	ttaaaaatat	atatatttta	aatatactta	aatatatatt	tctaatatct	ttaaatatat	13380
	atatatatatt	taaagaccaa	tttatgggag	aattgcacac	agatgtgaaa	tgaatgtaat	13440
	ctaataaag	cctaatacagc	ccaccatggt	ctccactgaa	aaatcctctt	tctttgggggt	13500
10	ttttctttct	ttcttttttg	attttgcact	ggacgggtgac	gtcagccatg	tacaggatcc	13560
	acaggggtgg	tgtcaaatgc	tattgaaatt	gtgttgaatt	gtatgctttt	tcacttttga	13620
	taaaaaaaca	tgtaaaaatg	tttcaaaaaa	ataataaaaat	aaataaaatc	gaagaatatg	13680
	tcaggacagt	cactgccttc	accttctcca	tttcacaccg	gtggtacaag	aaatcagaag	13740
	cctaggccag	gtgtgggtgg	tcatgcctgt	aatcccagca	ctttgggaag	ccgagggtggg	13800
15	tggatcacct	aagggtcagga	gtttgagacc	agcctggaca	acatgggtgaa	accccgtctc	13860
	tactaaaaat	acaaaaatta	gcggggcggtg	gtggctggcg	cctgtaatcc	cagctactcg	13920
	ggaggctgag	gcaggagaat	cacttgaagc	caggaggcag	agggtgcagt	gagctgagat	13980
	tgcaccactg	aactccaggc	tgggtggcag	agcgagactc	cctctcaaaa	aacaacaact	14040
	acaaagacaa	caacaaaccc	agaatcaaaa	tctgttggt	ccatagacct	catgggtgga	14100
20	agagaccttc	ctacatccag	gttggcccaa	catggggggag	tccatgaaat	ggtcacctca	14160
	gctctgccac	aagccccaag	gataagttga	ttctgccct	gggaatcatc	ctcaaaaagg	14220
	aaaaaaatgt	tcccctgcc	taaactttcc	acttatgcag	atgggcctgc	tcgtaagtca	14280
	ctgtcactgt	gggttcccaa	ctctgttcat	gacacttcc	tccagcacca	aatgcttccc	14340
	acccctctac	tcccactccc	cattcttcaa	acccagctca	agttccagtt	cctccacctca	14400
25	ggacttccca	tggatccagc	caatatcact	ctcagggtccg	gcgcagtggc	ccacgcctgt	14460
	aatctcagca	ctttgggagg	ccggggcgag	aagattgctt	gaggccagga	gtttcagacc	14520
	agcctggaca	acatagttag	actc				14544

	<210> 2	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 2	
	aggaagaaat gtcagatgcg	20
	<210> 3	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 3	
	aggaatagag gaagaaatgt	20
	<210> 4	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 4	
	tgtcagatgc gtgccagct	20
60	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65		

ES 2 346 881 T3

	<400> 5		
	aggaagaaat gtcagatgcg tgcccagctc	30	
5	<210> 6		
	<211> 20		
	<212> ADN		
10	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 6		
	ataggaatag aggaagaaat	20	
15	<210> 7		
	<211> 30		
	<212> ADN		
20	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 7		
	ttttatTTTT ataggaatag aggaagaaat	30	
25	<210> 8		
	<211> 40		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 8		
	ttctgcttcc ttttatTTTT ataggaatag aggaagaaat	40	
35	<210> 9		
	<211> 60		
	<212> ADN		
40	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 9		
	ttctgcttcc ttttatTTTT ataggaatag aggaagaaat gtcagatgcg tgcccagctc	60	
45	<210> 10		
	<211> 16		
	<212> ADN		
50	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 10		
	gaagaaatgt cagatg	16	
55	<210> 11		
	<211> 12		
60	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 11		
65	aagaaatgtc ag	12	