

1. 核酸探针和寡核苷酸在制备用于评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应性以降低未来心血管事件的风险的试剂盒中的用途,其中所述核酸探针和寡核苷酸可通过与从所述个体中获得的核酸接触来确定所述人类个体载脂蛋白(a) (Apo(a)) 基因在 rs3798220 处的单核苷酸多态性的身份,其中在 rs3798220 处存在以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸有反应性,或者其中在 rs3798220 处存在以胸腺嘧啶或腺嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸无反应性。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述试剂盒还可用于确定所述个体血样中脂蛋白(a) (Lp(a)) 的水平。

3. 权利要求 2 的用途,其中所述个体的血液中含有升高水平的 Lp(a)。

4. 权利要求 3 的用途,其中所述个体血样中的 Lp(a) 水平为 10mg/dl 或更高。

5. 权利要求 3 的用途,其中所述个体血样中的 Lp(a) 水平为 15mg/dl 或更高。

6. 权利要求 3 的用途,其中所述个体血样中的 Lp(a) 水平为 20mg/dl 或更高。

7. 权利要求 3 的用途,其中所述个体血样中的 Lp(a) 水平为 25mg/dl 或更高。

8. 权利要求 1 的用途,其中所述心血管事件是心肌梗死、中风、急性冠脉综合征、心肌缺血、慢性稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛、心血管疾病死亡、冠状动脉再狭窄、冠状动脉支架再狭窄、冠状动脉支架血栓再形成、血运重建、血管成形术、短暂性脑缺血发作、肺栓塞、血管闭塞或静脉血栓形成。

9. 权利要求 1 的用途,其中通过使从所述个体中获得的核酸与核酸探针接触来确定多态性的身份。

10. 权利要求 1 的用途,其中所述多态性的身份是通过等位基因特异性探针杂交、等位基因特异性引物延伸、等位基因特异性扩增、5' 核酸酶消化、分子信标测定、寡核苷酸序列连接测定、大小分析或单链构象多态性来确定的。

11. 权利要求 1 的用途,其中所述多态性的身份是通过从个体中获得的核酸进行测序来确定的。

12. 核酸探针和寡核苷酸在制备用于评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应性以降低未来心血管事件的风险的试剂盒中的用途,其中所述核酸探针和寡核苷酸可通过与从所述个体中获得的核酸接触来检测与所述人类个体载脂蛋白(a) (Apo(a)) 基因在 rs3798220 处的单核苷酸多态性(SNP) 连锁或连接不平衡的遗传标记的存在或不存在,其中所述遗传标记是 rs9457931 处的 SNP 或 rs9457927 处的 SNP,且其中所述连锁位于 Kringle(Kr) IV2 型结构域的 16、17 或 18 个重复之间。

13. 权利要求 12 的用途,其中所述遗传标记是等位基因、SNP、限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP) 或简单序列重复(SSR)。

14. 权利要求 12 的用途,其中在 rs3798220 处存在以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸有反应性。

15. 权利要求 12 的用途,其中在 rs3798220 处存在以胸腺嘧啶或腺嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸无反应性。

16. 权利要求 12 的用途,其中所述试剂盒还可用于确定个体血样中脂蛋白(a) (Lp(a)) 的水平。

17. 权利要求 12 的用途,其中所述心血管事件是心肌梗死、中风、急性冠脉综合征、心

肌缺血、慢性稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛、心血管疾病死亡、冠状动脉再狭窄、冠状动脉支架再狭窄、冠状动脉支架血栓再形成、血运重建、血管成形术、短暂性脑缺血发作、肺栓塞、血管闭塞或静脉血栓形成。

18. 如权利要求 1 所述的用途中制备的试剂盒,其中所述试剂盒包含用于确定所述人类个体载脂蛋白 (a) (Apo(a)) 基因在 rs3798220 处的单核苷酸多态性的身份的核酸探针和寡核苷酸,其中在 rs3798220 处存在以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸有反应性,或者其中在 rs3798220 处存在以胸腺嘧啶或腺嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸无反应性。

19. 如权利要求 12 所述的用途中制备的试剂盒,其中所述试剂盒包含用于检测与所述人类个体载脂蛋白 (a) (Apo(a)) 基因在 rs3798220 处的单核苷酸多态性 (SNP) 连锁或连接不平衡的遗传标记的存在或不存在的核酸探针和寡核苷酸,其中所述遗传标记是 rs9457931 处的 SNP 或位置 rs9457927 处的 SNP,且其中所述连锁位于 Kringle (Kr) IV2 型结构域的 16、17 或 18 个重复之间。

Apo(a) 基因中的多态性预测对乙酰水杨酸治疗的反应性

技术领域

[0001] 本发明涉及分析载脂蛋白(a) (Apo(a)) 基因中的核苷酸变异以评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应性的方法。

背景技术

[0002] 脂蛋白(a) (Lp(a)) 是一种血浆复合体,由通过二硫键共价连接到一个载脂蛋白 B-100 分子上的一个载脂蛋白(a) (Apo(a)) 分子与富含胆固醇的脂质一起组成 (Marcovina 等人, in Handbook of lipoprotein testing. Rifai 等人, Eds. :AACC Press, Washington, D. C. , 2000 ;p. 819)。Lp(a) 在正常生理学中的生物学功能仍未明确,高水平的 Lp(a) 与增加的心血管疾病风险和心血管事件如心肌梗死和中风有关,特别是在 LDL-C 也升高时 (Berglund 等人, Arterioscler Thromb Vase Biol 24, 2219 (2004) ;Hobbs 等人, Curr Opin Lipidol 10, 225 (1999) ;Danesh 等人, Circulation 102, 1082 (2000) ;Ridker 等人, JAMA 297, 611 (2007) ;Danik 等人, JAMA 296, 1363 (2006))。

[0003] 载脂蛋白(a) 基因座是人类基因组中最具多态性的基因座之一。Apo(a) 遗传变异与宽范围的 Lp(a) 水平相关,并且基本解释了 Lp(a) 的可遗传性 (Broeckel 等人, Nat Genet 30, 210 (2002) ;Boerwinkle 等人, J Clin Invest 90, 52 (1992) ;Mooser 等人, Am J Hum Genet 61, 402 (1997) ;Schmidt 等人, Eur J Hum Genet 14, 190 (2006))。最近,鉴定了 Apo(a) 基因中的几个单核苷酸多态性 (SNP), 它们与心血管疾病如心肌梗死、中风和 / 或药物反应如对他汀类药物的反应有关 (参见美国专利申请公开文本 US2005/0272054A1)。

[0004] 通常给未来心血管事件风险增加的个体开具乙酰水杨酸 (阿司匹林) 以降低心血管事件的风险。但是,乙酰水杨酸并非对所有个体都有效,并且对使用乙酰水杨酸 (阿司匹林) 作为心血管事件的一级预防药物存在争议,特别是对于女性而言,关于女性的数据非常少 (Ridker 等人, N Engl J Med 352, 1293 ;2005)。

[0005] 因此,需要不断改进药物筛选设计和治疗。在此方面,可以使用 SNP 以确定最适合用特定药物如乙酰水杨酸和 / 或其它抗血小板药和 / 或抗血栓药治疗的患者 (这通常被称为“药物遗传学”)。类似的,也可以使用 SNP 将患者从某些治疗中排除,这是由于患者发生毒副作用的可能性提高或对治疗没有反应的可能性提高。这样,这些 SNP 可用于定义特定干预对单独个体的收益 / 风险比。药物遗传学也可以在药学研究中使用,以帮助药物开发和选择过程。(Linder 等人, Clinical Chemistry, 43, 254 (1997) ;Marshall, Nature Biotechnology, 15, 1249 (1997) ;国际专利申请 WO 97/40462, SpectraBiomedical ;和 Schafer 等人, Nature Biotechnology, 16, 3 (1998))。

[0006] 发明简述

[0007] 本发明部分涉及评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应性以降低未来心血管事件的风险的方法。本发明部分基于发现 Apo(a) 基因中的新型核苷酸多态性允许推断出人类个体对乙酰水杨酸、特定剂量的乙酰水杨酸或对另外一种抗血小板药或抗血栓药的治疗是否具有反应性。本发明允许在开始治疗前确定对乙酰水杨酸治疗具有反应性的个体和没

有反应性的个体。本发明也允许在抗血小板药和抗血栓药中选择最有可能对特定个体提供降低心血管事件风险的最高益处的药物。公开的多态性也可作为靶标用于设计诊断试剂和开发治疗剂,该诊断试剂和治疗剂用于诊断和治疗心血管事件和相关疾病。

[0008] 根据本发明的一个方面,提供了一种评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应性以降低未来心血管事件的风险的方法。该方法包括确定人类个体载脂蛋白(a) (Apo(a)) 基因在位置染色体6:160880877处的单核苷酸多态性的身份(2006年3月汇编-NCBI版本36.1; rs3798220dbSNP@NCBI)。在一些重要的实施方案中,在位置染色体6:160880877处存在以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸治疗有反应性。在其它重要的实施方案中,在位置染色体6:160880877处存在以胸腺嘧啶或腺嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸无反应性。

[0009] 如本领域普通技术人员所公知的,可以使用多种检测方法中的任意一种。常用的方法包括使从个体中获得的核酸与核酸探针接触,或者对从个体中获得的核酸进行测序。这些方法的例子包括但不限于等位基因特异性探针杂交、等位基因特异性引物延伸、等位基因特异性扩增、5' 核酸酶消化、分子信标测定、寡核苷酸序列连接测定、大小分析和单链构象多态性。在一些重要的实施方案中,通过对从个体中获得的核酸进行测序来确定多态性的身份。

[0010] 根据本发明的另一方面,提供了一种试验。该试验包括使药剂接触由在染色体6:160880877处具有核苷酸胞嘧啶或鸟嘌呤的 Apo(a) 基因(2006年3月汇编-NCBI版本36.1;rs3798220dbSNP@NCBI) 编码的分离的 Apo(a) 蛋白,评估该药剂与分离的 Apo(a) 蛋白或与脂蛋白(a) (Lp(a)) 的结合,以及将所述结合与对照进行比较。在一些实施方案中,对照包括测定乙酰水杨酸与分离的 Apo(a) 蛋白或与 Lp(a) 或与血小板的结合,或者测定乙酰水杨酸与血小板的相互作用。

[0011] 根据本发明的另一方面,提供了一种试验。该试验包括使药剂接触由在染色体6:160880877处具有核苷酸胸腺嘧啶或腺嘌呤的 Apo(a) 基因(2006年3月汇编-NCBI版本36.1;rs3798220dbSNP@NCBI) 编码的分离的 Apo(a) 蛋白,评估该药剂与分离的 Apo(a) 蛋白的结合,以及将所述结合与对照进行比较。在一些实施方案中,对照包括测定乙酰水杨酸与分离的 Apo(a) 蛋白或与 Lp(a) 或与血小板的结合,或者测定乙酰水杨酸与血小板的相互作用。

[0012] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗方法。该方法包括根据人类个体在染色体6:160880877处具有以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的 Apo(a) 多态性(2006年3月汇编-NCBI版本36.1;rs3798220dbSNP@NCBI) 选择人类个体,以及由于该个体具有所述多态性,而给该个体施用乙酰水杨酸,以降低未来心血管事件的风险。在一些实施方案中,该个体的血液中也含有升高水平的 Lp(a)。

[0013] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗方法。该方法包括根据人类个体在染色体6:160880877处具有以胸腺嘧啶或腺嘌呤为特征的 Apo(a) 多态性(2006年3月汇编-NCBI版本36.1;rs3798220dbSNP@NCBI) 选择人类个体,以及由于该个体具有所述多态性,而给该个体施用除乙酰水杨酸以外的抗血栓药,以降低未来心血管事件的风险。在一些实施方案中,该个体的血液中也含有升高水平的 Lp(a)。

[0014] 抗血栓药可以是噻吩并吡啶或噻吩并吡啶衍生物。噻吩并吡啶或噻吩并吡啶

衍生物的例子包括但不限于氯吡格雷、硫酸氯吡格雷、噻氯匹定、普拉格雷 (CS-747 或 LY 640315)、SR 25989 和 PCR 4099。抗血栓药还包括但不限于依诺肝素钠 (cenoxaparin sodium)、希美加群、阿昔单抗或替罗非班。其它抗血栓药的例子还包括纤溶酶原激活物 (例如激活酶、阿替普酶) (催化无活性纤溶酶原向纤溶酶的转化)。这可以通过以下药物的相互作用发生: 前激肽释放酶、激肽原类、因子 XII、XIIIa、纤溶酶原激活剂前体和组织纤溶酶原激活物 (TPA)、链激酶、尿激酶、茴香酰化纤溶酶原-链激酶激活物复合体、尿激酶原 (Pro-UK)、rTPA (阿替普酶或激活酶; r 表示重组)、rPro-UK、雅激酶、依米那酶、Streptase、阿那格雷、盐酸阿那格雷、比伐卢定、达肝素钠、达那肝素钠、盐酸达唑氧苯、硫酸依非加群、依诺肝素钠、伊非曲班、伊非曲班钠、亭扎肝素钠、瑞替普酶 (retaplase)、三苯格雷、华法林、右旋糖酐类、氨基己酸 (bbv) 和氨甲环酸 (Amstat), 磺吡酮、双嘧达莫、氯贝丁酯、吡啶氨基甲酸酯、PGE、胰高血糖素、抗 5-羟色胺药、咖啡因、茶碱己酮可可碱 (Theophyllin Pentoxifyllin) 和噻氯匹定。抗血栓药还包括与血小板受体 (包括但不限于 PAR-1 和 PAR-2 受体) 以及凝血酶的血小板受体和血小板 ADP 受体如 P2Y₁₂ 特异性结合的抗血栓药。

[0015] 根据本发明的另一方面, 提供了一种评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应性以降低未来心血管事件的风险的方法。该方法包括检测是否存在或不存在与人类个体载脂蛋白 (a) (Apo (a)) 基因在位置染色体 6:160880877 处的单核苷酸多态性 (SNP) (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 连锁或连锁不平衡的遗传标记。该遗传标记可以是等位基因、SNP、限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP) 或简单序列重复 (SSR)。

[0016] 在一些实施方案中, 所述遗传标记是位置染色体 6:160849894 处的 SNP (NCBI 版本 128 ;rs9457931dbSNP@NCBI)。在一些实施方案中, 所述遗传标记是位置染色体 6:160830272 处的 SNP (NCBI 版本 128 ;rs9457927dbSNP@NCBI)。在一些实施方案中, 所述连锁位于 Kringle (Kr) IV 2 型结构域的 16、17 或 18 个重复之间。

[0017] 在一些重要的实施方案中, 在位置染色体 6:160880877 处存在以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸有反应性。在其它重要的实施方案中, 在位置染色体 6:160880877 处存在以胸腺嘧啶或腺嘌呤为特征的多态性指示对乙酰水杨酸无反应性。在一些实施方案中, 该方法进一步包括测定个体血样中脂蛋白 (a) (Lp(a)) 的水平。

[0018] 根据本发明的另一方面, 提供了一种治疗方法。该方法包括根据人类个体具有与染色体 6:160880877 处以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的 Apo (a) 多态性 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 连锁或连锁不平衡的遗传标记来选择人类个体, 以及由于该个体具有所述多态性, 而给该个体施用乙酰水杨酸, 以降低未来心血管事件的风险。

[0019] 所述遗传标记可以是等位基因、SNP、限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP) 或简单序列重复 (SSR)。在一些实施方案中, 人类个体的血液中也含有升高水平的脂蛋白 (a) (Lp(a))。

[0020] 在一些实施方案中, 遗传标记是位置染色体 6:160849894 处的 SNP (NCBI 版本 128 ;rs9457931dbSNP@NCBI)。在一些实施方案中, 遗传标记是 6:160830272 处的 SNP (NCBI 版本 128 ;rs9457927dbSNP@NCBI)。在一些实施方案中, 所述连锁位于 Kringle (Kr) IV 2 型结构域的 16、17 或 18 个重复之间。

[0021] 根据本发明的另一方面, 提供了一种治疗方法。该方法包括根据人类个体具有

与染色体 6:160880877 处以胸腺嘧啶或腺嘌呤为特征的 Apo(a) 多态性 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 连锁或连锁不平衡的遗传标记选择人类个体, 以及由于该个体具有所述多态性, 而给该个体施用除乙酰水杨酸以外的抗血栓药, 以降低未来心血管事件的风险。在一些实施方案中, 人类个体的血液中也含有升高水平的脂蛋白 (a) (Lp(a))。

[0022] 所述遗传标记可以是等位基因、SNP、限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP) 或简单序列重复 (SSR)。在一些实施方案中, 人类个体的血液中也含有升高水平的脂蛋白 (a) (Lp(a))。

[0023] 根据本发明的另一方面, 提供了一种评估人类个体的未来心血管事件的风险的方法。该方法包括确定人类个体 Apo(a) 基因在位置染色体 6:160880877 处的单核苷酸多态性的身份 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI), 以及确定人类个体血样中脂蛋白 (a) (Lp(a)) 的水平。在一些实施方案中, 人类个体 Apo(a) 基因在位置染色体 6:160880877 处存在以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的多态性 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 和在个体血样中存在升高水平的 Lp(a) 指示该个体具有升高的未来心血管事件的风险。

[0024] 除非另外说明, 以下实施方案同样地适用于本文所述的本发明的各个方面。

[0025] 心血管事件可以是心肌梗死、中风、急性冠脉综合征、心肌缺血、慢性稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛、心血管疾病死亡、冠状动脉再狭窄、冠状动脉支架再狭窄、冠状动脉支架血栓再形成、血运重建、血管成形术、短暂性脑缺血发作、肺栓塞、血管闭塞或静脉血栓形成。

[0026] 在一些实施方案中, 所述方法进一步包括测定个体血样中的 Lp(a) 水平。在一些实施方案中, 个体的血液中含有升高水平的 Lp(a)。个体血样中的 Lp(a) 水平可以是大约 10mg/dl 或更高、大约 15mg/dl 或更高、大约 20mg/dl 或更高、大约 25mg/dl 或更高、大约 30mg/dl 或更高、大约 35mg/dl 或更高、大约 40mg/dl 或更高、大约 45mg/dl 或更高、大约 50mg/dl 或更高。测定 Lp(a) 水平可以使用多种方法中的任意一种。这些方法是本领域普通技术人员已知的。Danik 等人, JAMA 296, 1363 (2006) 描述了测定 Lp(a) 水平的方法的一个例子。

[0027] 下面更详细地描述本发明的这些和其它方面。

附图说明

[0028] 图 1 是显示 Lp(a) 与 rs3798220 基因型之间的关系的一组图。A) 来自 WHS 的高加索女性研究参加者中的 Lp(a) 水平 (中位值 = 10.3mg/dL), B) rs3798220 的三个基因型之间如 A) 所述的 Lp(a) 水平。这三个基因型的四分位数间距 (IQR) 和中位值用方框及其中线表示。须线 (whiskers) 跨过 Lp(a) 值的范围, 可达中位值的 IQR 的 1.5 倍, 而超出须线的极端 Lp(a) 值用圆形表示。C) 具有杂合基因型的高加索女性的 Lp(a) 水平 (中位值 = 79.3mg/dL)。低 Lp(a) 和高 Lp(a) 亚群中的 Lp(a) 分布模型分别用拟合对数正态分布和正态分布表示。D) 具有 rs3798220 杂合基因型的来自 PHS 的高加索男性中的 Lp(a) 分布 (中位值 = 66.9mg/dL, 使用与来自 WHS 的样本不同的试验测定, 见方法部分)。

[0029] 图 2 是显示阿司匹林治疗降低由 rs3798220 或升高的 Lp(a) 导致的风险的一组

图。患有突发血管疾病的高加索 WHS 参加者的累积分数的 Kaplan-Meier 估值,他们 A) 根据 rs3798220 基因型和 WHS 试验过程中对于主要血管事件的复合终点事件的阿司匹林或安慰剂分配进行分类, B) 如同 A), 但是终点事件是心肌梗死, C) 如同 A), 但是终点事件是缺血性中风, D) 在 rs3798220 的次要等位基因 (TT 基因型) 的非携带者中, 根据高于或低于第 90 百分位数 (65.1mg/dL) 的 Lp(a) 水平和对于主要血管事件的复合终点事件的阿司匹林或安慰剂分配进行分类。

[0030] 图 3 是显示非西班牙白种人中 KrIV2r 数分布的一组柱状图。

[0031] 图 4 是显示根据非西班牙白种人中的 KrIV2r 数确定的 Lp(a) 水平分布的图。

[0032] 图 5 是显示根据非西班牙白种人中的 rs3798220 基因型确定的具有显著不同的 Lp(a) 水平的 KrIV2r (即等位基因) 数。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明部分地涉及与个体对乙酰水杨酸治疗的反应性相关的 Apo(a) 基因中的 SNP, 以降低未来心血管事件的风险。本发明还涉及单独使用 Apo(a) 基因中的多态性, 或者与脂蛋白 (a) (Lp(a)) 水平组合使用, 来评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应, 并且涉及基于此的治疗方法。本发明还涉及鉴定和设计新型抗血栓药。

[0035] 本文使用的术语“评估”当用于个体对乙酰水杨酸治疗的反应性时, 是指利用分析人类个体核酸样本中该个体 Apo(a) 基因在位置染色体 6:160880877 处的核苷酸身份 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 的方法, 得出关于对乙酰水杨酸治疗的反应的结论, 以及将单核苷酸多态性 (SNP) 的存在与位置染色体 6:160880877 处核苷酸存在的已知关系 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 进行比较。核苷酸存在可以通过检查核酸分子直接确定, 或者可以通过检查由 Apo(a) 基因编码的多肽间接确定。

[0036] 对乙酰水杨酸治疗的反应性是指, 在其它方面统计学上类似的个体集合中, 与未进行乙酰水杨酸治疗的个体相比, 接受乙酰水杨酸治疗的在人类个体载脂蛋白 (a) (Apo(a)) 基因的位置染色体 6:160880877 处具有以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的多态性 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 的个体不太可能具有未来心血管事件。

[0037] 在侧翼序列中, 根据加利福尼亚大学的 Santa Cruz Genome Browser, 在位置染色体 6:160880877 处与乙酰水杨酸反应性有关的等位基因 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 是:

[0038] 5' -GCTCCAAGAACAGCCTAGACACTTC C

[0039] ATTCCTGAACATGAGATTCGAGGT-3' (SEQ ID NO :1)

[0040] 3' -CGAGGTTCTTGTCGGATCTGTGAAG G

[0041] TAAAGGACTTGTACTCTAAGCTCCA-5' (SEQ ID NO :2)

[0042] (正 (" +") 链是上链, 负 (" -") 链是下链)。

[0043] 根据加利福尼亚大学的 Santa Cruz Genome Browser, 在位置染色体 6:160880877 处与乙酰水杨酸非反应性有关的等位基因 (2006 年 3 月汇编 -NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 是:

[0044] 5' -GCTCCAAGAACAGCCTAGACACTTC T

[0045] ATTCCTGAACATGAGATTCGAGGT-3' (SEQ ID NO :3)

[0046] 3' -CGAGGTTCTTGTCGGATCTGTGAAG A

[0047] TAAAGGACTTGTACTCTAAGCTCCA-5' (SEQ ID NO :4)

[0048] (正 (" + ") 链是上链, 负 (" - ") 链是下链)。

[0049] Apo(a) 基因 SNP 在美国专利申请公开 US2005272054 中描述, 命名为 rs3798220hCV25930271。Apo(a) 基因 SNP 也可以通过美国专利申请公开 US2005/0272054A1 (其完整内容在此引入作为参考) 中描述的引物序列 CGAATCTCATGTTTCAGGAAAATA (SEQ ID NO :5) 的匹配而发现。

[0050] 术语人类个体包括具有心血管事件的人、怀疑发展为心血管事件的人或可能易发生未来心血管事件或具有未来心血管事件风险的无症状个体。因此, 在一些实施方案中, 所述人类个体已经具有主要 (第一) 心血管事件, 例如心肌梗死, 或者已经进行血管成形术。已经具有主要心血管事件的人类个体具有升高的次要 (第二) 心血管事件的风险。在一些实施方案中, 人类个体不具有主要心血管事件, 但是具有升高的心血管事件的风险性, 因为该人类个体具有一种或多种心血管事件风险因素。在一些实施方案中, 为了降低未来心血管事件的风险, 个体已经接受疗法的治疗。该疗法可以是以下所述治疗剂中的任意一种。在其它实施方案中, 个体已经具有主要心血管事件, 并且具有一种或多种其它风险因素。在一些实施方案中, 人类个体接受治疗 (例如, 抗血脂治疗, 如他汀类药物治疗), 以降低未来心血管事件的风险。在一些实施方案中, 人类个体处于急性冠脉综合征中, 并且为了控制直接心血管事件和防止事件复发而正在作出治疗决定。

[0051] 心血管事件的风险因素的例子包括: 高脂血症、肥胖、糖尿病、高血压、高血压前期、升高的全身炎症标记水平、年龄、心血管事件家族史和吸烟。心血管事件的风险程度取决于人类个体所具有的风险因素的数量和严重程度或等级。可以获得风险图表和预测算法, 用于根据风险因素的存在和严重性估计人类个体中心血管事件的风险。一个这样的例子是 Framingham 心脏研究 (Framingham Heart Study) 风险预测评分。如果计算个体 10 年 Framingham 心脏研究风险评分大于 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19% 或 20%, 则该人类个体具有升高的心血管事件的风险性。

[0052] 估计人类个体的心血管事件风险的另一种方法是全面风险评分, 其中向 Framingham 心脏研究风险预测评分中加入全身炎症标记如 CRP 水平的测定。估计人类个体的心血管事件风险的其它方法包括冠状动脉钙扫描、心脏磁共振成像和 / 或磁共振血管造影术 (Ridker 等人, JAMA 297,611,2007)。

[0053] 高脂血症是高胆固醇血症和 / 或高甘油三酯血症。高胆固醇人类个体和高甘油三酯人类个体的心血管事件发生率升高。高胆固醇人类个体是符合当前为高胆固醇人类个体建立的标准个体。高甘油三酯人类个体是符合当前为高甘油三酯人类个体建立的标准个体。高胆固醇个体的 LDL 水平 > 160mg/dL, 或者 LDL 水平 > 130mg/dL, 并且具有至少两种选自以下的风险因素: 男性、早发冠心病家族史、吸烟、高血压、低 HDL (< 35mg/dL)、糖尿病、超高胰岛素血症、腹部肥胖、高脂蛋白和心血管事件个人史。高甘油三酯人类个体的甘油三酯 (TG) 水平 \geq 250mg/dL。

[0054] 高血压被定义为收缩压 > 140mm Hg, 和 / 或舒张压 > 90mm Hg, 或者同时符合这两个条件。高血压前期被定义为收缩压介于 115mm Hg 和 140mm Hg 之间, 和 / 或舒张压介于

80mm Hg 和 90mm Hg 之间。

[0055] 肥胖是脂肪组织块过多的状态。尽管体重指数 (BMI) 不是肥胖的直接量度,但是它是最广泛使用的测量肥胖的方法,BMI 等于体重/身高²(kg/m²) (参见,例如,Harrison' s Principles of Experimental Medicine,15thEdition, McGraw-Hill, Inc., N. Y., 下文称为" Harrison' s")。基于实际发病率的数据,在男性和女性中都最常使用 BMI = 30 作为肥胖的阈值。BMI 介于 25 和 30 之间应当视为医学上显著的并且应当进行治疗干预,特别是存在受肥胖影响的风险因素如高血压和葡萄糖耐受不良时。尽管肥胖常常被视为等同于体重增加,但不一定是这样。瘦但是肌肉非常发达的个体,虽然没有增加脂肪,但是根据任意标准可能是超重的。其它量化肥胖的方法包括人体测量术(皮褶厚度)、密度测定法(水中称重),计算断层 x 射线照相术(CT) 或磁共振成像(MRI) 和 / 或电阻抗。

[0056] 糖尿病是空腹血浆葡萄糖水平为 125mg/dL 或更高的人类个体。

[0057] 升高的全身炎症标记水平是高于健康人类个体群体(即,没有疾病体征和症状的人类个体)的平均值的水平。当全身炎症的标记是 CRP 时,认为 CRP 水平 ≥ 1 是升高的水平。

[0058] 用于降低未来心血管事件风险的疗法包括但不限于饮食和 / 或锻炼和 / 或使用以下药物的治疗:降血脂药、抗炎药、抗血栓药、纤维蛋白溶解药、抗血小板剂、直接凝血酶抑制剂、糖蛋白 IIb/IIIa 受体抑制剂、与细胞粘附分子结合并且抑制白细胞附着到这些分子上的能力的药物(例如抗细胞粘附分子抗体)、 α 肾上腺素能阻断剂、 β 肾上腺素能阻断剂、环加氧酶-2 抑制剂、血管紧张素系统抑制剂、抗心律失常药、钙通道阻滞剂、利尿剂、正性肌力药、血管扩张剂、血管加压剂、噻唑啉二酮类、大麻素-1 受体阻断剂和 / 或它们的任意组合。

[0059] 降血脂药是降低总胆固醇、降低 LDLC、降低甘油三酯和 / 或增加 HDLC 的药剂。抗血脂药包括他汀类药物和非他汀类降血脂药,和 / 或它们的组合。他汀类药物是一类显示能有效降低人总胆固醇、LDLC 和甘油三酯水平的药物。他汀类药物作用于胆固醇合成步骤。通过抑制 HMG-CoA 还原酶基因,降低细胞所合成的胆固醇的量,他汀类药物启动事件循环,以肝细胞的 LDLC 摄取增加作为结束。随着 LDLC 摄取增加,血液中的总胆固醇和 LDLC 水平降低。这两种因子的较低的血液水平与较低的动脉粥样硬化和心脏病的风险有关,而且他汀类药物被广泛用于降低动脉粥样硬化的发病率和死亡率。

[0060] 他汀类药物的例子包括但不限于辛伐他汀(舒降之(Zocor))、洛伐他汀(美降脂(Mevacor))、普伐他汀(普拉固(Pravachol))、氟伐他汀(来适可(Lescol))、阿托伐他汀(立普妥(Lipitor))、西立伐他汀(拜可(Baycol))、瑞舒伐他汀(可定(Crestor))、匹伐他汀(pitavastatin) 和其它许多药物。

[0061] 非他汀类降血脂药包括但不限于纤维酸衍生物(贝特类药物)、胆汁酸螯合剂或树脂、烟酸药物、胆固醇吸收抑制剂、酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 抑制剂、胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 抑制剂、LDL 受体拮抗剂、类法尼醇 X 受体 (FXR) 拮抗剂、固醇调节结合蛋白裂解激活蛋白 (SCAP) 活化剂、微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTP) 抑制剂、鲨烯合酶抑制剂和过氧化物酶体增殖激活受体 (PPAR) 激动剂。

[0062] 纤维酸衍生物的例子包括但不限于吉非贝齐 (Lopid)、非诺贝特 (Tricor)、氯贝丁酯 (Atromid) 和苯扎贝特。

[0063] 胆汁酸螯合剂或树脂的例子包括但不限于考来维仑 (WelChol)、考来烯胺 (Questran 或 Prevalite) 和考来替泊 (Colestid)、DMD-504、GT-102279、HBS-107 和 S-8921。

[0064] 烟酸药物的例子包括但不限于尼克酸和普罗布考。

[0065] 胆固醇吸收抑制剂的例子包括但不限于依折麦布 (Zetia)。

[0066] ACAT 抑制剂的例子包括但不限于阿伐麦布、CI-976 (Parke Davis)、CP-113818 (Pfizer)、PD-138142-15 (Parke Davis)、F1394 和美国专利 6,204,278、6,165,984、6,127,403、6,063,806、6,040,339、5,880,147、5,621,010、5,597,835、5,576,335、5,321,031、5,238,935、5,180,717、5,149,709 和 5,124,337 中描述的大量其它药物。

[0067] CETP 抑制剂的例子包括但不限于托彻普 (Torcetrapib)、CP-529414、CETi-1、JTT-705 和美国专利 6,727,277、6,723,753、6,723,752、6,710,089、6,699,898、6,696,472、6,696,435、6,683,099、6,677,382、6,677,380、6,677,379、6,677,375、6,677,353、6,677,341、6,605,624、6,586,448、6,521,607、6,482,862、6,479,552、6,476,075、6,476,057、6,462,092、6,458,852、6,458,851、6,458,850、6,458,849、6,458,803、6,455,519、6,451,830、6,451,823、6,448,295、5,512,548 中描述的其它大量药物。

[0068] FXR 拮抗剂的一个例子是香胶甾酮 (Guggulsterone)。SCAP 激活剂的一个例子是 GW532 (GlaxoSmithKline)。

[0069] MTP 抑制剂的例子包括但不限于英普他派和 R-103757。

[0070] 鲨烯合酶抑制剂的例子包括但不限于萨拉哥酸。

[0071] PPAR 激动剂的例子包括但不限于 GW-409544、GW-501516 和 LY-510929。

[0072] 本发明包括确定 Apo (a) 基因中的多态性。多态性是群体中存在的等位基因变异体。多态性可以是在一个基因座处存在的单核苷酸差异,或者可以是一个或数个核苷酸在基因的一个位置处的插入或缺失。这样,单核苷酸多态性 (SNP) 的特征为群体中在基因组如人类基因组中的特定基因座处存在一种或两种、三种或四种核苷酸 (即腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤或胸腺嘧啶),一般少于全部四种核苷酸。

[0073] 本领域技术人员可以容易地认识到,核酸分子可以是双链分子,并且当提到一条链上的特定位点时也指互补链上的相应位点。在定义 SNP 位置、SNP 等位基因或核苷酸序列时,提到核酸分子一条链上特定位点处的腺嘌呤、胸腺嘧啶 (胸腺嘧啶)、胞嘧啶或鸟嘌呤也 (分别) 定义了该核酸分子的互补链上相应位点处的胸腺嘧啶 (胸腺嘧啶)、腺嘌呤、鸟嘌呤或胞嘧啶。因此,可以提及任意一条链以提到特定 SNP 位置、SNP 等位基因或核苷酸序列。探针和引物可以设计成与任意一条链杂交,并且此处公开的 SNP 基因分型方法通常可以针对任意一条链。

[0074] 确定 Apo (a) 基因中核苷酸的身份可以通过以下步骤进行,例如,将核酸样品与寡核苷酸探针或引物一起温育,所述寡核苷酸探针或引物选择性杂交包含所述核苷酸的核酸分子,或在核酸分子附近杂交,并检测该引物或探针的选择性杂交。探针的选择性杂交可以通过例如可检测地标记探针并且利用印迹型分析如 Southern 印迹分析检测该探针的存在来检测。引物的选择性杂交可以通过例如进行引物延伸反应并检测包含该引物的引物延伸

反应产物来检测。如果需要,引物延伸反应可以通过聚合酶链反应进行。该方法可以包括鉴定一种或多种核苷酸。

[0075] 许多分析方法可以用来检测本发明的多态性位点处是否存在变异核苷酸。通常,等位基因变异的检测需要突变鉴别技术、任选的扩增反应和任选的信号产生系统。许多突变检测技术(其中一些基于 PCR)可以与许多信号产生系统组合使用。Nollau 等人, *Clin. Chem.* 43, 1114-1120, 1997 和标准教科书例如 "Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. by U. Landegren, Oxford University Press, 1996 和 "PCR", 2nd Edition by Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997 中综述了许多现有的检测等位基因变异的方法。美国专利申请公开 US2005/0272054A1 中描述了 Apo(a) 基因 SNP 检测和基因分型方法和试剂,其全部内容在此引入作为参考。

[0076] 为了确定两个具有序列同源性的分子的两个核苷酸序列或两个氨基酸序列的百分同一性,为了最佳比较的目的将序列进行比对(例如,为了最佳比对,可以向第一和第二核酸或氨基酸序列中的一个或两个中引入空位,并且为了比较目的可以忽视非同源序列)。在一些实施方案中,为了比较的目的,比对至少 30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 或更高的参比序列长度。然后比较相应氨基酸位点或核苷酸位点处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位点被与第二序列相应位点相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,这些分子在该位点处是相同的(本文使用的氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。两个序列之间的百分同一性是这两个序列共有的相同位点数的函数,同时考虑为了两个序列的最佳比对而需要引入的空位数和每个空位的长度。

[0077] 序列的比较和两个序列之间百分同一性的确定可以使用数学算法实现。(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje; G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。在一些实施方案中,两个氨基酸序列之间的百分同一性使用 Needleman 和 Wunsch 的算法 (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) 来确定。

[0078] 在一些实施方案中,两个核苷酸序列之间的百分同一性使用 GCG 软件包中的 GAP 程序来确定 (Devereux, J., 等人, *Nucleic Acids Res.* 12(1): 387 (1984)), 其中使用 NWSgapdna. CMP 矩阵和 40、50、60、70 或 80 的空位权重,和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重。在其它实施方案中,两个氨基酸或核苷酸序列之间的百分同一性使用 E. Myers 和 W. Miller 的算法 (CABIOS, 4: 11-17 (1989), 已经并入 ALIGN 程序 (2.0 版) 中) 来确定,其中使用 PAM 120 权重残基表、空位长度罚分 12 和空位罚分 4。

[0079] 为了分析 SNP,可以适当地使用替代性 SNP 等位基因特异性寡核苷酸。这些检测靶序列中单核苷酸变异的寡核苷酸可以被称为如“等位基因特异性寡核苷酸”、“等位基因特异性探针”或“等位基因特异性引物”等术语。用于分析多态性的等位基因特异性探针的设计和应用例如在 *Mutation Detection A Practical Approach*, ed. Cotton 等人. Oxford University Press, 1998; Saiki 等人, *Nature* 324, 163-166 (1986); Dattagupta,

EP235,726 ;和 Saiki, WO 89/11548 中有描述。

[0080] 每种等位基因特异性引物或探针的设计取决于下述变量 :如位于靶核酸分子中 SNP 位置侧翼的核苷酸序列的精确组成和引物或探针长度等,引物和探针使用中的另一个因素是探针或引物与靶序列之间进行杂交的条件严格性。较高的严格性条件使用较低的离子强度和 / 或较高的反应温度,并且往往需要在探针 / 引物与靶序列之间具有更完美的匹配,以形成稳定的双链体。但是,如果严格性太高,杂交可能根本不会发生。相反,较低的严格性条件使用具有较高离子强度的缓冲液和 / 或较低的反应温度,并且虽然在探针 / 引物与靶序列之间具有较多错配的碱基但仍允许形成稳定的双链体。例如但不是限制性的,使用等位基因特异性探针的高严格性杂交条件的示例性条件如下 :与含有 $5\times$ 标准磷酸缓冲液 -EDTA (SSPE)、 0.5% NaDodSO₄ (SDS) 的溶液在 55°C 下预杂交,将探针与靶核酸分子在相同溶液中和相同温度下温育,然后在 55°C 或室温下用含有 $2\times$ SSPE 和 0.1% SDS 的溶液洗涤。

[0081] 等位基因特异性引物延伸反应可以使用中度严格性条件,在约 46°C 下使用含有例如约 50mM KCl 的溶液。或者,该反应可以在升高的温度如 60°C 下进行。在另一个实施方案中,适合寡核苷酸连接测定 (OLA) 反应的中度严格性杂交条件可以在 46°C 的温度下使用大约 100mM KCl 的溶液,在该反应中如果两个探针与靶序列完全互补,则它们连接。

[0082] 在基于杂交的试验中,等位基因特异性探针可以设计为与来自一个个体的靶 DNA 的一个区段杂交,而不与来自另一个体的相应区段杂交,这是因为在来自两个个体的相应 DNA 区段中存在不同的多态性形式 (例如,替代性 SNP 等位基因 / 核苷酸)。杂交条件应当足够严格,使得等位基因之间的杂交强度具有明显可检测的差异,优选基本上二元响应,由此探针只与一个等位基因杂交,或者与一个等位基因的杂交明显更强。探针可以设计为与含有 SNP 位点的靶序列杂交,使得 SNP 位点在沿探针序列的任何位置对齐,该探针优选地设计为与靶序列的一个区段杂交,使得 SNP 位点与探针的中心位置 (例如,距探针的任一末端至少三个核苷酸的探针内位置) 对齐。探针的这种设计通常实现不同等位基因形式之间的杂交的良好鉴别。

[0083] 核苷酸序列 (多核苷酸或寡核苷酸) 可以是 RNA,也可以是 DNA,它们可以是基因或其一部分、cDNA、合成聚脱氧核糖核酸序列,等等,并且可以是单链或双链,以及 DNA/RNA 杂合体。在各种实施方案中,多核苷酸,包括寡核苷酸 (例如探针或引物),可以含有核苷或核苷酸类似物,或磷酸二酯键以外的骨架键。通常,包含多核苷酸的核苷酸是自然存在的脱氧核糖核苷酸,例如与 $2'$ - 脱氧核糖连接的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤或胸腺嘧啶,或是核糖核苷酸,例如与核糖连接的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤或尿嘧啶。但是,多核苷酸或寡核苷酸也可以含有核苷酸类似物,包括非自然存在的合成核苷酸或修饰的自然存在的核苷酸。这些核苷酸类似物是本领域公知的,并且可以商业上获得,含有这些核苷酸类似物的多核苷酸也是如此 (Lin 等人, Nucl. Acids Res. 22 :5220-5234 (1994) ;Jellinek 等人, Biochemistry 34 :11363-11372 (1995) ;Pagratis 等人, Nature Biotechnol. 15 :68-73 (1997), 均在此引入作为参考)。

[0084] 连接多核苷酸中的核苷酸的共价键通常是磷酸二酯键。但是,共价键也可以是其它许多键中的任何一种,包括硫二酯键、硫代磷酸键、肽样键或其它任何本领域中已知的可用于连接核苷酸以生成合成多核苷酸的键 (参见例如, Tarn 等人, Nucl. Acids Res. 22 :

977-986(1994);Ecker 和 Crooke, *BioTechnology* 13:351360(1995), 均在此引入作为参考)。当多核苷酸将要暴露于可能含有溶核活性的环境(包括例如组织培养基)时,或者在给活个体施用,由于修饰的多核苷酸可能对降解的敏感性较低,引入非自然存在的核苷酸类似物或连接核苷酸或类似物的键可能是特别有用的。

[0085] 包含自然存在的核苷酸和磷酸二酯键的多核苷酸或寡核苷酸可以化学合成,或者可以使用适当的多核苷酸作为模板使用重组 DNA 方法产生。相比之下,包含核苷酸类似物或磷酸二酯键以外的共价键的多核苷酸或寡核苷酸通常化学合成,尽管如 T7 聚合酶等酶可以将某些类型的核苷酸类似物并入多核苷酸中,并因此可以用于由适当的模板重组产生这样的多核苷酸(Jellinek 等人,同上,1995)。因此,本文使用的术语多核苷酸包括可以从细胞中分离的自然存在的核酸分子,以及可以通过例如化学合成法或酶法如聚合酶链反应(PCR)制备的合成分子。

[0086] 核酸检测样本通常为从个体(例如人)获得的血液、支气管肺泡灌洗液、痰或其他体液或组织的样本。应当理解,检测样本可以同样地是对应于检测样本中的序列的核酸序列,即,可以首先使用任何方便的技术如 PCR 扩增样本核酸中的区域的全部或一部分,然后进行等位基因变异的分析。

[0087] 在各种实施方案中,可检测地标记多核苷酸或寡核苷酸可能是有用的。多核苷酸或寡核苷酸的可检测标记是本领域中公知的。可检测标记的特定非限制性实例包括化学发光标记、放射性标记、酶、半抗原或独特的寡核苷酸序列。

[0088] 识别多态性的方法也可以使用特异性结合对成员来进行。本文使用的术语“特异性结合对成员”是指与特异性结合对的另一个成员特异性结合或选择性杂交的分子。特异性结合对成员包括例如探针、引物、多核苷酸、抗体等。例如,特异性结合对成员包括与包含多态性位点的靶多核苷酸选择性杂交的引物或探针,或与使用靶多核苷酸作为模板产生的扩增产物杂交的引物或探针。

[0089] 本文使用的术语“特异性相互作用”或“特异性结合”等是指两个分子形成在生理条件下相对稳定的复合物。该术语在本文中用于各种相互作用,包括,例如,结合包含多态性位点的多核苷酸的抗体的相互作用;或结合多肽的抗体的相互作用,该多肽包含由含有多态性位点的密码子编码的氨基酸。

[0090] 根据本发明的方法,抗体可以选择性结合包含由含有多态性位点的密码子编码的特定氨基酸的多肽。或者,抗体可以优先结合被引入多态性位点内的修饰的特定核苷酸,只有当某些核苷酸存在该多态性位点处时才引入该核苷酸,例如使用引物延伸试验引入该核苷酸。

[0091] 特异性相互作用通常在生理条件下稳定,该生理条件包括,例如,在活的个体例如人或其它脊椎动物或无脊椎动物中存在的条件,以及在细胞培养例如用来维持哺乳动物细胞或来自另一种脊椎动物或无脊椎动物的细胞的细胞培养中存在的条件。测定两种分子是否特异性相互作用的方法是公知的,包括例如平衡透析、表面等离子体共振等。

[0092] 本领域中已知许多确定样本中特定多态性的核苷酸存在的方法。这些方法可以使用一种或多种寡核苷酸探针或引物,包括例如与包含 Apo(a) 基因中的一种或多种多态性的靶多核苷酸选择性杂交的扩增引物对。

[0093] 等位基因特异性引物在扩增反应如 PCR 反应中通常与固定的引物一起使用,该

反应通过选择性扩增特定序列位置处的一个等位基因,提供等位基因之间的鉴别,例如,如 ARMS™ 试验中所使用的。等位基因特异性引物优选地是 17-50 个核苷酸,更优选地是约 17-35 个核苷酸,更优选地是约 17-30 个核苷酸。

[0094] 等位基因特异性引物优选地与待检测的等位基因完全对应,但是也可以是其衍生物,其中 3' 末端大约 6-8 个核苷酸与待检测的等位基因对应,而其中多达 10 个,例如多达 8、6、4、2 或 1 个其余的核苷酸可以不同,并且不显著影响引物的性质。

[0095] 引物可以使用任何方便的合成方法制备。这些方法的例子可以在标准教科书中找到,例如 " Protocols for Oligonucleotides and Analogues ;Synthesis and Properties, " Methods in Molecular Biology Series ;Volume 20 ;Ed. Sudhir Agrawal, Humana ISBN :0-89603-247-7 ;1993 ;1st Edition。如果需要,可以标记引物,以方便检测。

[0096] 等位基因特异性寡核苷酸探针可用于检测本文定义的位置处的 Apo (a) 基因多态性。这些探针的设计对本领域具有普通技能的分子生物学研究人员来说将是显而易见的。这些探针为任何合适的长度,例如长度可达 50 个碱基、可达 40 个碱基、更方便地可达 30 个碱基,例如长度为 8-25 或 8-15 个碱基。通常,这些探针包含与基因中相应的野生型或变异基因座完全互补的碱基序列。但是,如果需要,也可以引入一个或多个错配,只要寡核苷酸探针的鉴别能力没有受到不当的影响即可。为了方便检测,本发明的探针可以携带一个或多个标记。

[0097] 可用于实施本发明的方法的寡核苷酸探针可以包括,例如,与靶多核苷酸的一部分互补的寡核苷酸,或横跨靶多核苷酸的一部分的寡核苷酸,所述靶多核苷酸的一部分包含所述多态性的所述位置,其中根据该探针的选择性杂交的存在或不存在来检测该位置处特定核苷酸的存在。这种方法可以进一步包括使所述靶多核苷酸和杂交的寡核苷酸与内切核酸酶接触,并检测所述探针的酶切产物的存在或不存在,这取决于所述多态性位点处的核苷酸存在是否与该探针的相应核苷酸互补。

[0098] 寡核苷酸连接试验也可以用来鉴定多态性位置处的核苷酸存在,其中一对探针在多态性位点的上游和邻近处以及下游和邻近处选择性杂交,并且其中一个探针的末端核苷酸与多态性的核苷酸存在互补。当探针的末端核苷酸与所述核苷酸存在互补时,选择性杂交包括末端核苷酸,使得在连接酶存在时,上游和下游寡核苷酸连接。这样,连接产物的存在或不存在指示多态性位点处的所述核苷酸存在。

[0099] 寡核苷酸也可以作为引物,例如,用于引物延伸反应,其中延伸反应的产物(或不存在的产物)指示所述核苷酸存在。另外,可用于扩增含有 SNP 位点的靶多核苷酸一部分的引物对可能是有用的,其中检查扩增产物以确定多态性位点处的所述核苷酸存在。特别有用的方法包括易于适合高通量形式、多路形式或这两者的方法。引物延伸或扩增产物可以被直接或间接检测,和 / 或可以使用本领域公知的各种方法测序。横跨多态性基因座的扩增产物可以使用传统测序方法进行测序(例如,“双脱氧介导的链终止法”,也被称为“Sanger 法”(Sanger, F., 等人, J. Molec. Biol. 94 :441 (1975) ;Prober 等人. Science 238 : 336-340 (1987)), 和“化学降解法”,也被称为“Maxam-Gilbert 法”(Maxam, A. M., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 74 :560 (1977)), 这两篇参考文献均在此引入作为参考), 以确定所述 SNP 基因座处的所述核苷酸存在。

[0100] 可以确定 Apo (a) 基因中核苷酸身份的方法包括使用“微量测序”法。微量测序法

只确定“预定”位点处一个核苷酸的身份。这些方法特别可用于确定靶多核苷酸中的多态性的存在和身份。

[0101] 这些微量测序法,以及其它确定多态性基因座处核苷酸存在的方法,在 Boyce-Jacino 等人的美国专利 6,294,336 中描述,该专利在此引入作为参考。

[0102] 微量测序法包括 Goelet, P. 等人 (WO 92/15712, 在此引入作为参考) 公开的 Genetic Bit 分析法。其它用于测定 DNA 中多态性位点的引物指导的核苷酸掺入法也已描述 (Komher, J. S. 等人, Nucl. Acids. Res. 17 :7779-7784 (1989) ; Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18 :3671 (1990) ; Syvanen, A. -C, 等人, Genomics 8 :684-692 (1990) ; Kuppaswamy, M. N. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 88 :1143-1147 (1991) ; Prezant, T. R. 等人, Hum. Mutat. 1 :159-164 (1992) ; Ugozzoli, L. 等人, GATA 9 :107-112 (1992) ; Nyren, P. 等人, Anal. Biochem. 208 :171-175 (1993) ; 和 Wallace, W089/10414)。这些方法与 Genetic Bit 分析的不同在于它们都依赖于引入标记的脱氧核苷酸,以鉴别多态性位点处的碱基。在这种形式中,由于信号与掺入的脱氧核苷酸数目成比例,在相同核苷酸运行中存在的多态性可以产生与运行长度成比例的信号 (Syvanen, A. -C, 等人. Amer. J. Hum. Genet. 52 :46-59 (1993))。

[0103] Mundy, C. R. (美国专利 4,656,127) 和 Cohen, D. 等人 (法国专利 2,650,840 ; PCT 申请 W091/02087) 提供了可替代的微量测序方法,其中记载了用于确定多态性位点的核苷酸身份的基于溶液的方法。如在美国专利 4,656,127 的 Mundy 方法中,使用与位于多态性位点紧邻 3' 侧的等位基因序列互补的引物。

[0104] 针对使用凝胶电流分析序列中遇到的困难,已经开发了替代性微量测序方法。例如, Macevicz (美国专利 5,002,867) 描述了通过与多种寡核苷酸探针混合物杂交来确定核酸序列的方法。根据这种方法,通过使靶标与在一个位置处具有固定核苷酸在其它位置处具有变异核苷酸的一组探针相继杂交,确定该靶多核苷酸的序列。Macevicz 法通过以下步骤确定靶标的核苷酸序列:使靶标与一组探针杂交,然后确定该组的至少一个成员能够与靶标杂交的位点数(即,“匹配”数)。重复该程序,直到一组探针中的每个成员都得到检测。

[0105] Boyce-Jacino 等人的美国专利 6,294,336 提供了用于确定核苷酸分子 (DNA 或 RNA) 序列的固相测序法,该方法使用选择性结合一个位点处的多核苷酸靶标的引物,其中, SNP 是与靶标选择性结合的最 3' 侧的核苷酸。

[0106] 因此,使用上述方法,与乙酰水杨酸反应相关的单元型等位基因或与乙酰水杨酸反应相关的 SNP 的核苷酸存在可以使用扩增反应、引物延伸反应或免疫测定来确定。与乙酰水杨酸反应相关的单元型等位基因或与乙酰水杨酸反应相关的 SNP 的核苷酸存在也可以通过以下步骤来确定:在结合对成员在与乙酰水杨酸反应相关的 SNP 处或附近特异性结合的条件下,使样本中的多核苷酸或源自样本的多核苷酸接触与包含乙酰水杨酸反应相关 SNP 的多核苷酸区域选择性杂交的特异性结合对成员。所述特异性结合对成员可以是抗体或多核苷酸。

[0107] 在本发明的方法中使用的抗体包括与含有 Apo (a) 基因中的多态性的多核苷酸特异性结合的抗体。另外,抗体可结合包括由包含多态性的密码子编码的氨基酸的多肽。这些抗体可结合含有部分由多态性编码的氨基酸的多肽。其它可以使用的方法包括引入了修饰的核苷酸的基因分型方法,该核苷酸随后被抗体识别,例如, Illumina 的 Infinium II 测

定。

[0108] 这些抗体特异性结合包含第一氨基酸的多肽,该第一氨基酸由含有多态性基因座的密码子编码,但是这些抗体不结合或者较弱地结合包含第二氨基酸的多肽,该第二氨基酸由在 Apo(a) 基因中包含不同核苷酸存在的密码子编码。

[0109] 抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、F(ab') 片段、由 Fab 表达文库产生的片段、抗独特型(抗-Id) 抗体(包括,例如,抗本发明抗体的抗-Id 抗体)和上述任何抗体的表位结合片段。本发明的免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚类的免疫球蛋白分子。

[0110] 抗体包括抗体片段,该抗体片段包括但不限于 Fab、Fab' 和 F(ab')₂、Fd、单链 Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fvs(sdFv) 和包含 VL 或 VH 域的片段。抗原结合抗体片段,包括单链抗体,可以包含单独的可变区或可变区与以下整体或部分的组合:铰链区、CH1、CH2 和 CH3 域。还包括也包含可变区与铰链区、CH1、CH2 和 CH3 域的任意组合的抗原结合片段。抗体可以来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体是人、鼠(例如小鼠和大鼠)、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡抗体。抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性或更高特异性的抗体。

[0111] 抗体可以通过本领域已知的任何合适的方法产生。目标抗原的多克隆抗体可以通过本领域熟知的各种方法生产。例如,可以对包括但不限于兔、小鼠、大鼠等的各种宿主动物施用本发明的多肽,以诱导产生包含该抗原特异性多克隆抗体的血清。根据宿主物种,可以使用各种佐剂来增强免疫应答,包括但不限于弗氏佐剂(完全和不完全弗氏佐剂)、矿物凝胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、多聚醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔蛾血蓝蛋白、二硝基苯酚和可能有用的人用佐剂,例如 BCG(卡介苗)和短小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)。这些佐剂也是本领域所公知的。

[0112] 单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术来制备,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术,或它们的组合。例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤技术生产,包括本领域已知的和在例如 Harlow 等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling 等人, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (所述参考文献全文引入作为参考)中教导的那些技术。本文使用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指来源于包括任何真核、原核或噬菌体克隆在内的单一克隆的抗体,不是生产它的方法。

[0113] 在获得所有相关表型和基因型信息后,进行统计学分析,以确定等位基因或基因型的存在与个体表型特征之间是否有显著相关性。可以计算 SNP 之间的等位基因频率、Hardy-Weinberg 平衡统计数据 and 连锁不平衡(LD)。然后可以使用例如 EM 算法(Excoffier 和 Slatkin, *Mol Biol Evol.* 1995 Sep; 12(S): 921-7) 计算单元型。也可以采用其它方法推断单元型,而不使用 EM 方法估计频率。这些方法基于进化史的重建,包括重组和联合,并且存在于例如程序 PHASE (Stephens, M., Smith, N. 和 Donnelly, P. *American Journal of Human Genetics*, 68, 978-989, 2001) 中。除了如连锁不平衡系数、等位基因频率、卡方统计数据等各种参数外,还可以计算其它群体遗传参数,如 Panmitic 指数,来控制病例组和对照组之

间的种族、祖先或其它系统变异。

[0114] 优选地,在对遗传相关性进行统计学检验之前首先进行数据监视和清除。样本的流行病学数据和临床数据可以使用具有表和图的描述统计学数据总结。优选地进行数据核实以检查数据完成、不一致的录入和离群值。然后对于离散变量和连续变量,可以分别利用卡方检验和 t-检验(如果为非正态分布,则使用 Wilcoxon 秩和检验)检查病例与对照之间的显著性差异。为了确保基因分型质量,可以分别对病例和对照进行 Hardy-Weinberg 不平衡检验。在病例和对照中个体标记都明显偏离 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)可以指示基因分型错误。如果在大多数标记中违背 HWE,则指示应当进一步研究群体子结构。而且,病例中的 Hardy-Weinberg 不平衡只能表示标记与疾病的遗传相关性(Genetic Data Analysis, Weir B., Sinauer(1990))。

[0115] 为了检验单 SNP 的等位基因是否与表型性状的病例或对照状态相关,本领域技术人员可以比较病例和对照中的等位基因频率。可以在 2×2 表(2 个 SNP 等位基因 \times 感兴趣的分类性状中的 2 个结果)上进行标准卡方检验和 Fisher 精确检验。为了检验 SNP 的基因型是否相关,可以在 3×2 表(3 个基因型 \times 2 个结果)上进行卡方检验。也对基因型相关性进行计分检验,以对比病例和对照中的三个基因型频率(主要纯合子、杂合子和次要纯合子),并且使用 3 种不同的遗传方式(即显性(对比系数为 2, -1, -1)、加成(对比系数为 1, 0, -1)和隐性(对比系数为 1, 1, -2))寻找趋势。使用希望的置信限(通常为 95%)计算次要等位基因与主要等位基因的优势比(odds ratios)以及杂合和纯合变体与野生型基因型的优势比。

[0116] 如果多态性具有区别病例矩阵和对照的数值,该多态性可以以描述任何关系的数学形式呈现,并且伴随有相关性(检验与效果)统计学数据。可以使用显示多态性标记与乙酰水杨酸反应的相关性的统计学分析结果,其使用至少 80%、85%、90%、95%或 99%,最优选 95%的置信度,或者小于 0.05 的非显著性概率。

[0117] 在另一方面,本发明的诊断方法可以用来评估乙酰水杨酸治疗降低未来心血管事件风险的药物遗传学。携带 Apo(a) 基因特定等位基因变体的个体因此可能显示与不同药剂或治疗如乙酰水杨酸治疗反应的改变的能力。这可能直接影响所述个体对药物治疗的反应。本发明的诊断方法可用于预测对乙酰水杨酸治疗的临床反应和确定治疗剂量。

[0118] 因此,本发明提供了选择或制订治疗方案的方法(例如,确定是否对个体施用乙酰水杨酸的方法,选择特定治疗方案如乙酰水杨酸给药剂量和频率或者为预测不可能对乙酰水杨酸治疗有反应的个体选择替代抗血栓治疗(即,非乙酰水杨酸)的方法,以及确定经历乙酰水杨酸治疗导致的毒性或其它不希望的副作用的可能性的方法,等等)。本发明还提供了选择下述个体的方法,其中将基于该个体的基因型对其进行乙酰水杨酸治疗或其它治疗,以及基于个体的基因型为乙酰水杨酸治疗或其它治疗剂的为临床试验选择下述个体的方法(例如,选择最有可能正面响应乙酰水杨酸治疗的试验参与个体)。

[0119] 本发明的 SNP 也可以用来鉴定新型治疗靶标。例如,含有多态性或其产物的基因,以及直接或间接接受这些多态性或其产物调节或者与其相互作用的基因或其产物,可以用于治疗剂的开发。本发明的方法用于开发选择性针对 Apo(a) 基因的一种或多种变体的新疗法。确定特定变体与疾病发展倾向或药物治疗反应性之间的联系可能对新药的设计具有重要意义。药物可以设计为调节与疾病过程有关的变体的生物活性。治疗剂可以包括,例

如,调节靶基因或基因产物的功能或水平的小分子、蛋白质、蛋白质片段或肽、抗体、核酸或它们的衍生物或模拟物。

[0120] 根据本发明的另一方面,提供了一种包括本发明等位基因特异性核苷酸探针和/或本发明等位基因特异性引物的诊断试剂盒。该诊断试剂盒可以包括适当的包装和用于本发明的方法的说明书。这些试剂盒可以进一步包括适当的缓冲液和聚合酶,如热稳定聚合酶,例如 taq 聚合酶。

[0121] 在本发明的另一方面,可以使用本发明的单核苷酸多态性作为连锁研究中的遗传标记。这特别适用于相对高频率的多态性。低频率多态性对于如下所述的单元型分型可能特别有用。单元型是在单(父本或母本)染色体上的连锁多态性位点(如基因内)处发现的一组等位基因。如果基因内重组是随机的,则可能是多达 2^n 单元型,其中 2 是每个 SNP 处的等位基因数, n 是 SNP 数。一种鉴定与临床反应相关的突变或多态性的方法是使用在目标群体中可以鉴定的所有单元型进行相关性研究。每个单元型的频率受其最少见的等位基因的频率限制,因此具有低频率等位基因的 SNP 作为低频率单元型的标记特别有用。由于群体中与某些临床特征相关的特定突变或多态性可能具有低频率,低频率 SNP 在鉴定这些突变中可能特别有用。

[0122] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗方法。该治疗方法包括根据人类个体在染色体 6:160880877 处具有以胞嘧啶或鸟嘌呤为特征的 Apo(a) 多态性(2006 年 3 月汇编-NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 选择人类个体,以及由于该个体具有该多态性,而给该个体施用特定剂量的乙酰水杨酸或乙酰水杨酸以外的药剂(例如抗血栓药,如噻吩并吡啶或噻吩并吡啶衍生物),以降低不利的心血管事件的风险。

[0123] 优选地,确定人类个体的状态在临床上是有用的。临床有用性的例子包括决定施用哪种或哪些抗血栓药,和/或决定一种或多种药物的有效量。抗血栓药的例子在上面提供。

[0124] 本发明涉及评估人类个体对乙酰水杨酸治疗的反应性以降低未来心血管事件的风险的方法。本发明的方法部分基于确定个体 Apo(a) 基因在位置 6:160880877 处的核苷酸的身份(2006 年 3 月汇编-NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI),其单独或组合地允许得出关于该个体的乙酰水杨酸反应性的推断。乙酰水杨酸反应可以是心血管疾病风险的降低。这样,本发明的组合物和方法例如可用于鉴定或多或少可能对乙酰水杨酸治疗有反应或对乙酰水杨酸以外的抗血栓药治疗有反应的个体或患者。本发明的组合物和方法也可用于预测或确定个体或患者可能需要改变乙酰水杨酸或乙酰水杨酸以外的抗血栓药剂量,以降低心血管疾病的风险。

[0125] 根据本发明的另一方面,提供一种试验。该试验包括筛选优先结合 Apo(a) 蛋白(例如分离的 Apo(a) 蛋白)或由在位置染色体 6:160880877 处具有胞嘧啶或鸟嘌呤的 Apo(a) 基因(2006 年 3 月汇编-NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 编码的 Lp(a) 的药剂。

[0126] 本发明还提供一种试验。该试验包括筛选优先结合 Apo(a) 蛋白(例如分离的 Apo(a) 蛋白)或由在位置染色体 6:160880877 处具有胸腺嘧啶或腺嘌呤的 Apo(a) 基因(2006 年 3 月汇编-NCBI 版本 36.1 ;rs3798220dbSNP@NCBI) 编码的 Lp(a) 的药剂。

[0127] 筛选试验可以用来在抗血栓药中选择优先结合多态性的药物。可以通过改变或制

备现有抗血栓药的形式,然后在本发明的筛选试验中检测这些形式优先结合一种或另一种多态性的相对能力,进行推理性药物设计。同样可以为这种结合筛查现有或新型药剂的化学文库。

[0128] 本领域技术人员熟悉筛选方法。筛选试验包括测定抗原结合 Lp(a) 蛋白的能力的试验。例如,筛选优先结合 Lp(a) 多态性的药剂,包括使该药剂接触 Lp(a) 多态性,确定该药剂与该 Lp(a) 多态性的结合,比较该药剂与不含该多态性的 Lp(a) 多态性的结合,其中与该药剂与不含该多态性的 Lp(a) 多态性的结合相比,该药剂与该 Lp(a) 多态性的结合增加表明该药剂对于该 Lp(a) 多态性是有效性提高的抗血栓药;其中与该药剂与不含该多态性的 Lp(a) 多态性的结合相比,该药剂与该 Lp(a) 多态性的结合降低表明该药剂对于该 Lp(a) 多态性是有效性降低的抗血栓药。本领域技术人员熟悉这种筛选方法和其它筛选方法,包括但不限于直接结合试验、竞争性结合试验、非竞争性结合试验、功能抑制试验、高通量筛选试验等。

[0129] 参考以下实施例对本发明说明,但不限制本发明。

实施例

[0130] 实施例 1

[0131] 脂蛋白 (a) [Lp(a)] 是一种血浆组分,由通过二硫键共价连接到一个载脂蛋白 B-100 分子上的一个 (Apo(a)) 分子与富含胆固醇的脂质一起组成 (1)。尽管 Lp(a) 的生物学功能仍未明确 (2,3),但是高水平的 Lp(a) 与增加的心血管 (CV) 风险有关,特别是在 LDL-C 也升高时 (4-6)。Lp(a) 的胆固醇运载方面使相关心血管风险的研究主要集中于基于脂质的生物学 (7-11)。但是,载脂蛋白 (a) 也与纤溶酶原高度同源,并且尽管载脂蛋白 (a) 中缺乏公认的蛋白水解活性,这种同源性使心血管风险的替代研究集中于 Lp(a) 在止血、血小板功能和血栓形成中的作用 (12-18)。

[0132] 载脂蛋白 (a) 基因座是人类基因组中最具多态性的基因座之一。Apo(a) 遗传变异与宽范围的 Lp(a) 水平相关,并且基本说明了 Lp(a) 的可遗传性 (19-22)。大多数影响 Lp(a) 水平的已知变异形式是位于该蛋白质氨基末端的 Kringle(Kr) IV 2 型结构域的 3-40 个重复 (1,23)。这种高度的 Kr IV 2 型多态性对于测定血浆 Lp(a) 水平是个挑战,直到最近开发出了识别载脂蛋白 (a) 单 Kr V 结构域并且不与 Kr IV 2 型重复有交叉反应的检测试剂 (24,25)。其它与 Lp(a) 水平有关的载脂蛋白 (a) 基因变异包括启动子中特别是五核苷酸序列 TTTTA 的单核苷酸多态性 (SNP) 以及插入-缺失多态性 (26-28)。另外,载脂蛋白 (a) 基因座的多态性似乎涉及拷贝数变化 (29)。

[0133] 最近,已经提出编码载脂蛋白 (a) 的纤溶酶原蛋白酶样结构域中异亮氨酸向甲硫氨酸置换的 SNP rs3798220 是与 Lp(a) 水平和普遍存在的心血管疾病都有关联的一种新型候选物 (Luke 等人,已提交 (30))。因此在来自妇女健康研究 (WHS) 的 26,274 名最初健康的女性中确定了这种多态性的基因型,她们被随机分入低剂量阿司匹林组或安慰剂组,然后进行 10 年期的突发心血管事件随访 (31)。这种设置不仅提供了预期性评估 rs3798220 与 Lp(a) 水平和血管风险相关性的机会,而且提供了预期性评估阿司匹林与风险的遗传效应之间的相互作用的机会。尽管大多数研究参加者是高加索人,但是有足够数目的非高加索人参加者解决了对 rs3798220 与 Lp(a) 水平之间相关性的群体特异性影响,这种影

响在以前对具有不同生物地理祖先的群体之间的其它载脂蛋白 (a) 变体的比较中曾发现 (32-36)。

[0134] 在 25,038 名 WHS 高加索人参加者中,904 名 (3.6%) 杂合子和 15 名 (0.06%) 纯合子携带载脂蛋白 (a) 基因中 rs3798220 的次要等位基因,次要等位基因频率为 1.9%。这些基因型代表次要等位基因的杂合子的轻微缺乏和纯合子的过量导致的与 Hardy-Weinberg 平衡的边界偏差 ($p = 0.048$)。在这三个基因型类别中,年龄、BMI、吸烟率、激素替代疗法的采用和绝经状态以及高血压和糖尿病的发病率没有不同 (表 1)。但是,次要等位基因的杂合子 (79.3mg/dL) 和纯合子携带者中的中位值 Lp(a) 水平 (153.9mg/dL) 分别比非携带者中的 Lp(a) 水平 (10.0mg/dL, $p \ll 0.001$) 高 8 倍和 15 倍 (表 1,图 1A,B)。这种效应似乎是适度但显著的相关血浆组分总胆固醇、LDL-C 和载脂蛋白 B 升高的原因,这是通过在 Lp(a) 水平调节后消除显著性而判断的。其它血浆生物标记,包括炎症标记和其它脂质组分,与 rs3798220 基因型无关。在与非携带者的临床特征比较中,在组合次要等位基因杂合与纯合携带者的分析中获得基本相同的结果 (数据未显示)。

[0135] 高加索杂合子中 Lp(a) 水平的分布与非携带者中的分布完全不同,并且具有完全的双峰型,这可以将这一亚群分为一个 Lp(a) 大于 27.9mg/dL (中位值为 92.4mg/dL, $N = 627$) 的组和 Lp(a) 小于 27.9mg/dL (中位值为 5.0mg/dL, $N = 260$) 的第二组 (图 1A-C)。次要等位基因的所有纯合携带者的 Lp(a) 水平都大于 27.9mg/dL,但是该组中的个体太少,因而不能评估 Lp(a) 分布的形状 (图 1B)。rs3798220 杂合子中的 Lp(a) 的双峰分布在包括来自医生健康研究 (PHS) 的 1058 名高加索男性的第二无关群体中得到证实,其中 rs3798220 的次要等位基因频率为 1.8%,类似于高加索 WHS 女性中的频率 (图 1D)。

[0136] 高加索杂合子中 Lp(a) 水平的双峰性质不能用标准临床特征来解释。例如,在具有低或高 Lp(a) 的高加索杂合女性的比较中,在年龄、BMI、吸烟、糖尿病、绝经状态、高血压、心脏病家族史或应用激素替代疗法方面没有显著性差异。类似的,HDL-C、载脂蛋白 A1、甘油三酯、C 反应蛋白、可溶性 ICAM-1、纤维蛋白原、肌酸酐、高半胱氨酸和 HbA1c 在杂合子的两个亚群中均相当,并且类似于主要等位基因纯合子中的水平。而且,美国的总体地理分配 (gross geographic assignment) 没有提示双峰 Lp(a) 水平具有地区基础。与具有低 Lp(a) 的杂合子相比,在具有高 Lp(a) 的杂合子中,LDL-C、总胆固醇和载脂蛋白 B 水平显著升高 (中位值:LDL-C,130.5mg/dL 相对于 122.5mg/dL;总胆固醇,219.0mg/dL 相对于 210.4mg/dL;载脂蛋白 B,109.9mg/dL 相对于 103.1mg/dL;均为 $p < 0.01$),但是在用 Lp(a) 校正后差异再次没有显著性。因此,在杂合子中观察到的这些脂质的较高水平可以用 Lp(a) 的增加来解释。在高加索杂合 WHS 参加者中,这些脂质中的任一种均观察到双峰分布。

[0137] 在 10 年随访期间,总共经历 825 例总 CVD 复合终点首次事件的 24,320 名高加索研究参加者中,杂合子中单拷贝的 rs3798220 次要等位基因使未来血管事件的风险增加大约 50% (表 2;年龄校正的 HR 1.50,95% CI :1.09-2.05, $p = 0.012$)。在 15 名次要等位基因纯合携带者中没有事件发生,符合总的低发病率,因此从未来突发疾病风险的分析中排除了这些极少的个体。对于 MI、缺血性中风和血运重建等特定终点事件,rs3798220 的效应的强度类似。因此,对于临床上更相关的主要血管事件终点事件 (非致命的 MI、非致命的缺血性中风和心血管疾病死亡),年龄校正的风险比为 1.58 (95% CI :1.07-2.33, $p = 0.021$)。在对传统心血管风险因素进行校正后,这些效应仍然是统计学显著的,因此总血管

事件的完全校正的风险比为 1.50 (1.07-2.10, $p = 0.009$), 主要血管事件的完全校正的风险比为 1.54 (CI :1.01-2.35, $p = 0.043$)。杂合子中几乎所有增加的风险都限于 Lp(a) 水平升高的参与者 (表 2)。例如, 对于主要心血管事件, 具有高 Lp(a) 的杂合子的年龄校正的风险比 [1.78 (CI :1.26-2.51, $p = 0.001$)] 大于所有杂合子并且更显著, 而具有低 Lp(a) 的杂合子的风险比 [0.84 (CI :0.84-1.77, $p = 0.65$)] 小于非携带者中的风险并且在统计学上没有不同 (表 2)。

[0138] 分配至低剂量阿司匹林治疗组基本消除了高加索 rs3798220 杂合子中突发心血管事件风险的增加 (图 2)。具体而言, 在杂合子中, 随机分配至阿司匹林组与主要血管事件的相对风险降低 59% 有关 (95% CI :0.81-0.10, $p = 0.025$), 而在非携带者中, 随机分配至阿司匹林组没有显著效果 (相对风险降低 9%, 95% CI :0.023 至 -0.09, $p = 0.31$) (图 2A)。形式上, 阿司匹林与基因型的这种相互作用是显著的 ($p = 0.05$, 年龄校正的模型)。对于 MI 和缺血性中风 (与急性斑块破裂和闭塞性血栓形成有关的临床事件) 的终点事件, 也观察到阿司匹林在基因型亚组中的不同效果。因此, 对于组合的主要突发血管事件 (年龄校正的 HR 2.19, 95% CI :1.39-3.46, $p = 0.0007$) 以及分别对于心肌梗死 (年龄校正的 HR 2.43, 95% CI :1.23-4.80, $p = 0.01$) 和缺血性中风 (年龄校正的 HR 2.41, 95% CI :1.26-4.59, $p = 0.008$), 在不使用阿司匹林的情况下杂合子的净遗传效果是总风险的大约两倍 (图 2A-C)。但是, 对于冠状动脉血运重建的终点事件 (与没有急性闭塞的基本疾病进展相关的临床事件; 相对风险降低 36%, 95% CI :0.89 至 -0.44, $p = 0.28$), 阿司匹林的效果减弱。

[0139] 阿司匹林与 rs3798220 基因型的相互作用似乎通常部分涉及阿司匹林与升高的 Lp(a) 水平的类似相互作用。在 rs3798220 次要等位基因的高加索非携带者中, 阿司匹林降低了 Lp(a) 水平高于第 90 百分位数 (65.1mg/dL) 者的血管事件的相对风险, 而在 Lp(a) 水平低于第 90 百分位数者中观察到极小效应 (图 2D)。对于血运重建终点事件, Lp(a) 水平高于第 90 百分位数的高加索人中的阿司匹林效应 (相对风险降低 39%, 95% CI :0.64-0.05, $p = 0.03$) 在强度上与杂合高加索人中的阿司匹林效应相当。

[0140] rs3798220 的次要等位基因的分布在 WHS 中的高加索人 (MAF = 1.9%) 和非高加索人之间明显不同。具体来说, 自我认定的非洲裔美国人中几乎不存在 rs3798220 处的变异 (MAF = 0.5%)。相反, 亚裔美国人 (MAF = 7.6%)、西班牙人 (MAF = 15.1%) 和美洲土著人 (MAF = 9.1%) 的次要等位基因比高加索人更普遍 (表 3)。非洲裔美国人与西班牙人、亚裔美国人或美洲土著人之间、西班牙人与亚洲人之间、以及他们与高加索人相比, 等位基因频率的差异都是显著的。HapMap 基因分型计划检测亚洲人的次要等位基因 (CHB+JPT, MAF = 5.6%), 而没有检测高加索人 (CEU) 或非洲人 (YRI) (37)。HapMap 亚洲人中的频率与 WHS 亚裔美国人亚群的频率没有显著性不同 ($p = 0.59$)。在高加索人中, 全美国的总体地理分类无法检测到可能与不同混杂程度有关的等位基因频率的地区差异。与在高加索人中的发现相反, 在 WHS 亚裔美国人或西班牙人亚群的杂合子中, Lp(a) 水平既没有升高, 也不是双峰型的, 这两个亚群都具有足够数目的参加者来评估 Lp(a) 的分布。同样, 这些群体中 rs3798220 与突发 CVD 之间似乎没有相关性, 尽管 rs3798220 导致突发 CVD 的能力是有限的。

[0141] 在最初健康的美国女性的这种大规模研究中, 载脂蛋白 (a) 基因中 rs3798220 多

态性的次要等位基因的高加索携带者 (30) 具有非常高的 Lp(a) 水平, 以及加倍的主要血管事件的风险。但是, 在随机分配至低剂量阿司匹林组的杂合子中, 这种升高的未来血管事件的风险被有效消除 (使用阿司匹林的相对风险降为 59%, $p = 0.025$)。相反, 在非携带者中, 从阿司匹林治疗得到的益处很低 (使用阿司匹林的相对风险降为 9%, $p = 0.31$)。在阿司匹林的抗血栓活性中, 这种药物遗传学结果与 Lp(a) 在血栓形成中的直接作用一致, 也许是通过如之前提到的 (13, 38) 纤溶酶原蛋白酶样结构域或 Kr 结构域的赖氨酸结合功能。发现阿司匹林对 rs3798220 与心肌梗死和中风的相关性的影响大于它对冠状动脉血运重建的影响, 这提出了如下具有吸引力的可能性: 阿司匹林与来自于特定载脂蛋白 (a) 等位基因的 Lp(a) 之间的相互影响对于急性斑块破裂和血管闭塞可能比对疾病进展更相关。目前还不清楚 rs3798220 药物遗传学效果是否也涉及可能的阿司匹林导致的等位基因依赖性载脂蛋白 (a) 表达降低 (39, 40)。再者, 这些数据提供了用于定义获得较高或较低阿司匹林治疗益处的亚群的直接遗传方法, 这个问题与在血管疾病的预防和治疗中有争议地选择阿司匹林或阿司匹林替代物如噻吩并吡啶有关 (31, 41, 42)。

[0142] 由 rs3798220 编码的非同义置换与 Lp(a) 水平和心血管风险之间的复杂关系的分子基础需要进一步阐明。特别是, 对 Lp(a) 水平和分布的遗传效果使得难以将对只与 Lp(a) 水平升高有关的风险和阿司匹林反应的效果与氨基酸置换引起的内在生物活性有关的效果区别开来, 后者也可能直接导致 Lp(a) 升高。同样, rs3798220 与载脂蛋白 (a) 基因座处的单元型之间的关系也不清楚, 但是可能涉及与高加索人中载脂蛋白 (a) 基因座的高表达等位基因的连锁, 例如, 具有数目异常的 2 型 Kringle IV 结构域 (43, 44)。这一假说可进一步解释 Lp(a) 分布的双峰型, 特别是在 rs3798220 与导致不同 Lp(a) 水平的两种或多种单元型连锁时。

[0143] 等位基因频率分析与亚洲 rs3798220 的至少一个来源一致, 但是没有解决这种变体在高加索人中的存在。由于高加索人中 rs3798220 频率适中并且其在全美国的分布缺乏明显的地区偏性, 与亚裔美国人混合似乎是无法解释。然而, 虽然非非洲人群体特有的大多数变异可能通过随机过程发生而不是通过正向选择发生 (45), rs3798220 与 Lp(a) 水平之间的相关性结合其在高加索人和其它非非洲人群中显著不同的频率说明选择和漂离都可能导致其生物地理分布。这两种过程与载脂蛋白 (a) 基因座高水平的群体特异性遗传变异和表达以及关于 Lp(a) 功能的推测相一致 (3)。

[0144] 除了提供关于 Lp(a) 生物学性质的线索以外, rs3798220 与 Lp(a) 水平、心血管风险和阿司匹林治疗效果之间的相关性说明了遗传学方法在理解常见复杂疾病中的潜力。就这点而言, 这些结果不仅提供了用于控制遗传变异引起的特定类型 CVD 风险的药物遗传学策略, 而且提供了通过基于基因的个体化用药给予最大可能精确性医疗保健的更大的希望。

[0145] 参考文献:

[0146] 1. S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, in Handbook of lipoprotein testing. N. Rifai, G. R. Warnick, M. H. Dominiczak, Eds. (AACC Press, Washington, D. C., 2000) 第 819 页.

[0147] 2. L. Berglund, R. Ramakrishnan, Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 2219 (2004).

- [0148] 3. H. H. Hobbs, A. L. White, *Curr Opin Lipidol* 10, 225 (1999).
- [0149] 4. J. Danesh, R. Collins, R. Peto, *Circulation* 102, 1082 (2000).
- [0150] 5. P. M. Ridker, J. E. Buring, N. Rifai, N. R. Cook, *JAMA* 297, 611 (2007).
- [0151] 6. J. Suk Danik, N. Rifai, J. E. Buring, P. M. Ridker, *JAMA* 296, 1363 (2006).
- [0152] 7. G. L. Cushing 等人, *Arteriosclerosis* 9, 593 (1989).
- [0153] 8. F. Paultre 等人, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2619 (2000).
- [0154] 9. D. Baldassarre, E. Tremoli, G. Franceschini, S. Michelagnoli, C. R. Sirtori, *Stroke* 27, 1044 (1996).
- [0155] 10. F. Kronenberg 等人, *Circulation* 100, 1154 (1999).
- [0156] 11. S. Tsimikas 等人, *N Engl J Med* 353, 46 (2005).
- [0157] 12. M. B. Boffa, S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, *Clin Biochem* 37, 333 (2004).
- [0158] 13. M. A. Hancock, M. B. Boffa, S. M. Marcovina, M. E. Nesheim, M. L. Koschinsky, *J Biol Chem* 278, 23260 (2003).
- [0159] 14. N. M. Caplice 等人, *Blood* 98, 2980 (2001).
- [0160] 15. R. Strater 等人, *Lancet* 360, 1540 (2002).
- [0161] 16. E. Angles-Cano 等人, *Chem Phys Lipids* 67-68, 369 (1994).
- [0162] 17. S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, *Curr Opin Lipidol* 14, 361 (2003).
- [0163] 18. B. R. Gabel, M. L. Koschinsky, *Biochemistry* 34, 15777 (1995).
- [0164] 19. U. Broeckel 等人, *Nat Genet* 30, 210 (2002).
- [0165] 20. E. Boerwinkle 等人, *J Clin Invest* 90, 52 (1992).
- [0166] 21. V. Mooser 等人, *Am J Hum Genet* 61, 402 (1997).
- [0167] 22. K. Schmidt, H. G. Kraft, W. Parson, G. Utermann, *Eur J Hum Genet* 14, 190 (2006).
- [0168] 23. S. M. Marcovina, H. H. Hobbs, J. J. Albers, *Clin Chem* 42, 436 (1996).
- [0169] 24. S. M. Marcovina 等人, *Clin Chem* 46, 1956 (2000).
- [0170] 25. S. M. Marcovina, M. L. Koschinsky, J. J. Albers, S. Skarlatos, *ClinChem* 49, 1785 (2003).
- [0171] 26. O. Rosby, K. Berg, *J Intern Med* 247, 139 (2000).
- [0172] 27. K. Valenti, E. Aveyrier, S. Leaute, F. Laporte, A. J. Hadjian, *Atherosclerosis* 147, 17 (1999).
- [0173] 28. J. P. Chretien 等人, *J Med Genet* 43, 917 (2006).
- [0174] 29. R. Redon 等人, *Nature* 444, 444 (2006).
- [0175] 30. M. M. Luke 等人, 已提交 (2007).
- [0176] 31. P. M. Ridker 等人, *N Engl J Med* 352, 1293 (2005).
- [0177] 32. C. N. Rotimi 等人, *Genet Epidemiol* 14, 157 (1997).
- [0178] 33. J. Rubin 等人, *J Lipid Res* 43, 234 (2002).
- [0179] 34. M. Scholz 等人, *Eur J Hum Genet* 7, 169 (1999) 第 17 页
- [0180] 35. H. G. Kraft 等人, *Eur J Hum Genet* 4, 74 (1996).
- [0181] 36. C. Sandholzer 等人, *Hum Genet* 86, 607 (1991).

- [0182] 37. The International HapMap Consortium, *Nature* 426,789(2003).
- [0183] 38. M. A. Hancock, C. A. Spencer, M. L. Koschinsky, *Biochemistry* 43, 12237(2004).
- [0184] 39. M. Akaike 等人, *Clin Chem* 48,1454(2002).
- [0185] 40. A. Kagawa, H. Azuma, M. Akaike, Y. Kanagawa, T. Matsumoto, *J BiolChem* 274, 34111(1999).
- [0186] 41. D. L. Bhatt 等人, *Am Heart J*150,401(2005).
- [0187] 42. M. A. Pfeffer, J. A. Jarcho, *N Engl J Med* 354,1744(2006).
- [0188] 43. D. Gavish, N. Azrolan, J. L. Breslow, *J Clin Invest* 84,2021(1989).
- [0189] 44. G. Utermann 等人, *J Clin Invest* 80,458(1987).
- [0190] 45. D. A. Hinds 等人, *Science* 307,1072(2005).

[0191] 材料与amp;方法

[0192] 研究群体:主要研究群体来自于妇女健康研究(WHS),这是在入选时至少为45岁的最初健康的妇女中进行的阿司匹林(隔日口服100mg)和安慰剂对心血管疾病初级预防的随机试验,对她们在10年期间随访(1,2)。入选时,参加者提供临床和人口统计学基础信息。28,345名WHS参加者提供血液进行血浆和遗传学分析。在这些样本中,使用Hitachi 917分析仪(Roche Diagnostics, Indianapolis, ID)通过不受Kr IV 2型重复数影响的比浊法测定基线Lp(a)水平(3)。其它脂质组分、炎症生物标记和其它血浆成分的基线测定在以前已有描述(4)。在随访期间判定的全部突发心血管事件包括一般与斑块破裂和血管闭塞有关的事件,如心肌梗死(MI)、缺血性中风和心血管疾病死亡,以及一般与动脉粥样硬化疾病进展有关的事件,定义为通过经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)或冠状动脉旁路移植术(CABG)的血运重建。主要突发心血管事件被定义为心肌梗死、缺血性中风或心血管疾病死亡。另外,在已经参加医生健康研究(PHS)的1058名高加索男性的独立组中评价rs3798220与血浆Lp(a)水平之间的相关性(5)。在这些PHS参加者中,利用基于ELISA的标准临床方法测定Lp(a)水平(6)。

[0193] 基因分型:通过寡核苷酸连接法确定WHS参加者中的rs3798220基因型,该方法将从3ng基因组DNA中PCR扩增靶序列与随后的等位基因特异性寡核苷酸连接组合起来(7)。两个等位基因的连接产物然后通过产物特异性寡核苷酸杂交进行分离,每个寡核苷酸都偶联到光谱不同的Luminex® 100TM×MAP微球(Luminex, Austin, TX)上。捕获的产物用链霉亲和素R-藻红蛋白(Prozyme, San Leandro, CA)荧光标记,基于微球的光谱进行分选,并且用Luminex® 100TM仪器检测(8)。使用基于荧光的等位基因特异性实时DNA扩增法(ABI, Foster City)来检测PHS中rs3798220处的基因型(9)。对于WHS和PHS群体,成功确定基因型的样本比例分别为96.3%和97.8%。在27,289名采集DNA样本进行基因分型的女性中,有25,436名完全确定rs3798220基因型、Lp(a)水平、年龄和突发心血管事件的发生。其中,24,320名是高加索人,468名是非洲裔美国人,282名是亚裔美国人,262名是西班牙人,62名是美洲土著人,42名的祖先不清楚。

[0194] 统计学方法:使用对数似然比检验评估Hardy-Weinberg平衡的偏差。通过ANOVA法对三个基因型类别之间临床协变量的差异估计正态分布特征,非正态分布的特征通过Kruskal-Wallis检验进行分析,分类特征通过卡方检验比例进行分析。类似的,用卡方

检验来确定具有不同生物地理祖先的群体对之间等位基因频率的差异显著性。为了分析 rs3798220 等位基因的 Lp(a) 水平和次要等位基因频率的地理偏性,将参加研究时的居住地分成 6 组,这 6 个组对应于美国东北部、南部、中西部、西南部、山区和远西部地区。用逻辑回归或卡方分析来确定这些分配在解释 Lp(a) 水平或等位基因频率中的重要性。使用用年龄或传统风险协变量(年龄、血压、糖尿病史、吸烟状态、心肌梗死家族史、LDL-C 和 HDL-C)校正的 Cox 比例风险模型预期性评估 rs3798220 与突发 CVD 风险之间的相关性。在报告的所有分析中,Cox 模型中比例的假设 ($p > 0.05$) 不能被否定。与阿司匹林治疗相关的风险的不同通过在 Cox 模型中包括相互作用项或者通过根据参加者分配至阿司匹林组或安慰剂组而将参加者分层的分析来确定。

[0195] 高加索人 rs3798220 杂合子中 Lp(a) 水平的检测显示了清楚的双峰分布。一个亚组具有近似对数正态分布的较低的 Lp(a) 水平,在次要等位基因非携带者中也观察到这种分布,而另一个亚组具有接近正态分布的较高的 Lp(a) 水平。因此,通过使用期望最大化 (EM) 算法将观察到的双峰分布建模为配合 Lp(a) 值的独立对数正态分布 [对于低 Lp(a)] 和正态分布 [对于高 Lp(a)] 的混合体,将这些参加者分类到低或高 Lp(a) 亚组中 (10)。对应于 EM 算法中责任值 (responsibility value) 0.5 的 Lp(a) 水平 27.9mg/dL 用于区别高 Lp(a) 组与低 Lp(a) 组。使用这种二分布模型进行分类基本上是清楚的,因为在 887 个赋值中有 806 个 (91%) 具有至少 95% 确定性的责任值。

[0196] 材料与方法的参考文献:

[0197] 1. I. M. Lee 等人, JAMA 294, 56 (2005).

[0198] 2. P. M. Ridker 等人, N Engl J Med 352, 1293 (2005).

[0199] 3. S. M. Marcovina 等人, Clin Chem 46, 1956 (2000).

[0200] 4. P. M. Ridker, N. Rifai, N. R. Cook, G. Bradwin, J. E. Buring, JAMA 294, 326 (2005).

[0201] 5. R. Y. Zee, S. Cheng, H. H. Hegener, H. A. Erlich, P. M. Ridker, Stroke 37, 2007 (2006).

[0202] 6. P. M. Ridker, C. H. Hennekens, M. J. Stampfer, JAMA 270, 2195 (1993).

[0203] 7. F. Barany, Proc Natl Acad Sci USA 88, 189 (1991).

[0204] 8. S. A. Dunbar, Clin Chim Acta 363, 71 (2006).

[0205] 9. J. B. de Kok, E. T. Wiegerinck, B. A. Giesendorf, D. W. Swinkels, Hum Mutat 19, 554 (2002).

[0206] 10. T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman, The elements of statistical learning (Springer-Verlag, New York, 2001), pp. 533.

[0207] 表 1. 根据基因型,高加索 WHS 参加者的基线临床分布

[0208]

	rs3798220 基因型*			p-值
	TT(N=24119)	TC (N=904)	CC (N= 15)	
临床特征				
年龄(岁)	52 (48.0-59.0)	52.0 (48.0 - 58.0)	52 (49.5-55.0)	0.352
BMI (kg/m ²)	24.9 (22.5 - 28.3)	24.7 (22.4 - 28.3)	24.9 (22.1 - 28.9)	0.758
高血压史(%)	5950 (24.7)	237 (26.2)	3 (20.0)	0.530
MI 家族史(%)	2801 (12.9)	127 (15.5)	2 (15.4)	0.077
目前吸烟(%)	2795 (11.6)	109 (12.1)	2 (13.3)	0.912
糖尿病(%)	614 (2.5)	22 (2.4)	0 (0.0)	0.944
HRT (%)	10472 (43.5)	419 (46.5)	9 (60.0)	0.100
绝经(%)	13139 (54.6)	486 (53.8)	8 (53.3)	0.907
脂质生物标记				
总胆固醇(mg/dL)	208.0 (184.0 - 235.0)	215.0 (189 - 241.0)	229 (208.5 - 250.0)	0.00031 [#]
LDL-C (mg/dL)	121.3 (100.4 - 144.2)	126.5 (105.5 - 149.2)	137.6 (118.8 - 157.4)	0.00022 [#]
载脂蛋白 B(mg/dL)	100.0 (83.3 - 121.3)	107.3 (87.1 - 125.1)	109.8 (100.4 - 127.0)	0.00001 [#]
HDL-C (mg/dL)	51.8 (43.1 - 62.2)	51.8 (43.5 - 62.4)	51.7 (46.0 - 66.8)	0.600
载脂蛋白 AI(mg/dL)	148.9 (132.3 - 167.9)	148.2 133.4 - 166.3)	145.2 (135.9 - 168.3)	0.983
甘油三酯(mg/dL)	119 (84 - 176)	117.0 (83.0 - 177.2)	104 (90.0 - 149.0)	0.890
Lp(a) (mg/dL)	10.0 (4.2 - 28.5)	79.3 (13.7 - 102.1)	153.9 (105.6 - 215.0)	<<0.001 ⁺
炎症生物标记				
C 反应蛋白(mg/L)	2.0 (0.8 - 4.4)	2.0 (0.8 - 4.2)	1.1 (0.9 - 2.4)	0.342
可溶性 ICAM-1(ng/ml)	342.9 (301.8 - 394.8)	343.8 (301.4 - 396.4)	349.4 (295.6 - 399.2)	0.961
纤维蛋白原(mg/L)	349.9 (307.0 - 401.1)	348.9 (307.6 - 401.7)	343.5 (318.4 - 382.7)	0.851
其它生物标记				
肌酸酐(mg/dL)	0.7 (0.6 - 0.8)	0.7 (0.6 - 0.8)	0.7 (0.7 - 0.8)	0.402
同型半胱氨酸 (umol/dL)	10.5 (8.7 - 12.9)	10.5 (8.7 - 12.8)	11.6 (8.6 - 12.7)	0.468
HbA1c (%)	5.0 (4.8 - 5.2)	5.0 (5.8 - 5.2)	4.9 (4.8 - 5.2)	0.658

*中位值(用于离散特征, N (%)的数量特征的四分位数间距)。

⁺分析 p=4.7×10⁻¹⁷⁷

[#]对 Lp(a)水平校正后没有显著性。

[0209] 表 2. 高加索人中 rs3798220 与心血管事件的相关性

[0210]

	rs3798220 基因型和 Lp(a) 水平						
				高 Lp(a)		低 Lp(a)	
	nts	HRCI)	p	HRCI)	p	HRCI)	p
全部突发 CVD	825	1.502.05)	0.012	1.782.51)	0.001	0.841.77)	0.650
主要突发 CVD	521	1.582.33)	0.021	1.852.83)	0.005	0.962.33)	0.930
心肌梗死	211	1.572.88)	0.150	1.833.57)	0.076	0.953.83)	0.940
缺血性中风	221	1.813.17)	0.039	2.013.79)	0.031	1.364.25)	0.600
血运重建	475	1.432.18)	0.092	1.792.80)	0.011	0.621.93)	0.410

比较杂合子与参比纯合子的主要等位基因基因型(TT)的 Cox 比例风险模型, 包括针对年龄的校正

[0211] 表 3. WHS 和 HapMap 亚群中 rs3798220 的次要等位基因频率

[0212]

组别	N [†]	MAF	HWE _p	MAF 的配对差异的 p 值						
				Hisp.	A.Am	As	N.Am	CHB+JPT	CEU	YRI
WHS 全部	26495	0.021	0.002	-	-	-	-	-	-	-
WHS 高加索人	25038	0.019	0.048	<0.001	0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.002	0.002
WHS 西班牙人	275	0.151	0.901	-	<0.001	<0.001	0.017	0.005	0.000	0.000
WHS 非洲裔美国人	486	0.005	0.872	-	-	<0.001	0.001	<0.001	0.274	0.272
WHS 亚洲人	360	0.076	0.940	-	-	-	0.244	0.593	0.005	0.005
WHS 美洲土著人	66	0.091	0.273	-	-	-	-	0.808	0.004	0.005
HapMap CHB+JPT	89	0.056	0.440	-	-	-	-	-	0.056	0.055
HapMap CEU	60	0.000	-	-	-	-	-	-	-	NA
HapMap YRI	60	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-

[†]具有 rs3798220 成功基因型的每个亚群中的个体数
NA, 不适用

[0213] 实施例 2

[0214] WHS 样本中位于 LPA 基因座和 LPA 基因座附近的另外 40 个 SNP 的基因分型, 以确定欧洲裔美国人、亚裔美国人和美洲西班牙人中具有 rs3798220 的 LD 中的 SNP 变异

[0215] 根据 rs3798220 基因型和自我报告的祖先 (欧洲裔美国人 (即白人 or 高加索人)、亚裔美国人或美洲西班牙人) 从 WHS 选择样本亚组, 我们对他们的 LPA (载脂蛋白 (a) 的基因) 和邻近基因座处的另外 40 个 SNP 进行了基因分型。然后我们估计了这些新 SNP 与 rs378220 之间的连锁不平衡 (LD)。因为这些样本不是随机选择的, 而是根据 rs3798220 基因型选择的, 我们不能简单地直接从样本估计等位基因频率和 LD, 考虑到基于 rs379220 的采样策略, 必须通过使观察到的基因型和预测的基因型之间的差异最小化来推断等位基因频率和 LD。结果显示:

[0216] 1) 两个 SNP (rs9457931dbSNP@NCBI (位置染色体 6:160849894NCBI 版本 128 处的单核苷酸多态性) 和 rs9457927dbSNP@NCBI (位置染色体 6:160830272NCBI 版本 128 处的单核苷酸多态性)) 在 WHS 高加索人 (欧洲裔美国人) 中几乎完全与 rs3798220 连锁不平衡。这两个 SNP 位于邻近的 LPAL2 基因中 (脂蛋白, Lp(a)- 样 2 前体基因, 邻近载脂蛋白 (a) 基因);

[0217] 2) 其它 SNP 与 rs3798220 有一定范围的 LD; 和

[0218] 3) 非欧洲人亚群中具有非常不同的 LD 模式。我们解释了这些结果,提出我们在实施例 1 中描述的效果与携带所有三个 SNP(rs3798220、rs9457931、rs9457927) 的等位基因有关。

[0219] 实施例 3

[0220] 在来自 Dallas 心脏研究的具有不同祖先的三个亚组中, rs3798220 基因型、Kringle IV 2 型重复数和 Lp(a) 表达之间的关系

[0221] 我们在 Dallas 心脏研究 (DHS) 中进行 rs3798220 基因分型 (The American Journal of Cardiology Volume 93, Issue 12, 15 June 2004, 第 1473-1480 页), 血浆 Lp(a) 的载脂蛋白 (a) 成分 (即表达的 apop(a) 蛋白) 中的 Kr IV, 2 型重复 (KrIV2r) 数之前已经确定 (Circulation. 2005 ;111 :1471-1479)。该群体包括男性和女性, 非西班牙白种人 (欧洲祖先)、黑种人 (非洲祖先) 和西班牙人, 总共 3529 个样本。该分析试图鉴定 rs3798220 次要等位基因和表达的 KrIV2r 数与对祖先的可能依赖性之间的对应关系。该分析以两种方式进行。首先, 考虑所有个体, 假定每个个体的 KrIV2r 等位基因 (在 DNA 水平上) 等于表达的等位基因 (在蛋白质水平上)。即, 假定只表达一个 KrIV2r 的个体在 LPA 基因座处具有该等位基因的两个拷贝 (3529 名个体)。第二, 我们只考虑具有两个明显不同的 KrIV2r 等位基因的个体 (总共 2859 名), 该分析中不包括只表达一个 KrIV2r 等位基因的 668 名。两者的结论非常类似。即, 1) 在非西班牙白种人中, rs3798220 次要等位基因与 17 个 KrIV2r 重复强烈相关, 与 16 或 18 个重复程度较低地相关 (尽管 16、17 和 18 个重复之间的差异可能与该试验对 KrIV2r 数目的分辨力有关) (图 3); 2) 在非西班牙白种人中, 具有较少数目的 KrIV2r 的等位基因通常表达较高水平的 Lp(a) (图 4); 3) 表达 17 个 KrIV2r 的非西班牙白种人具有高水平的 Lp(a), 而另外还携带一个 rs3798220 次要等位基因拷贝的个体具有甚至更高水平的 Lp(a) (第 11 页, 右下方) (图 5); 4) KrIV2r 的分布、它们与表达水平的相关性以及它们与 rs3798220 的相关性在不同祖先组中不同, 因此在非西班牙白种人中观察到的 rs3798220 与极端 Lp(a) 水平的相关性在其它祖先组中未观察到。

WHS, 高加索人
全部

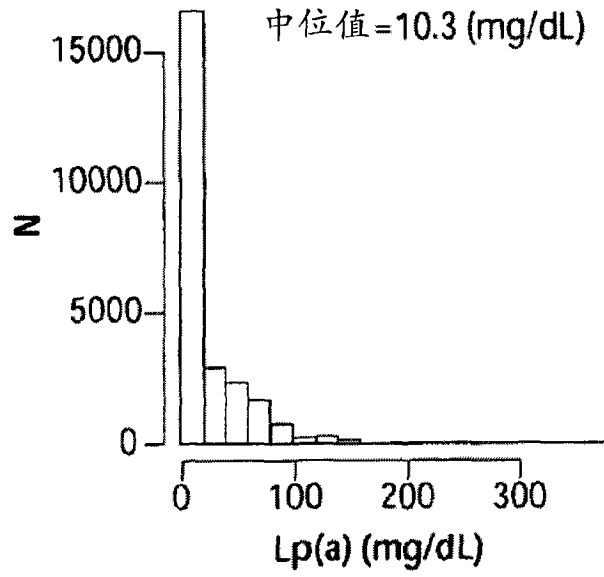


图 1A

WHS, 高加索人
根据 rs3798220 基因型分组

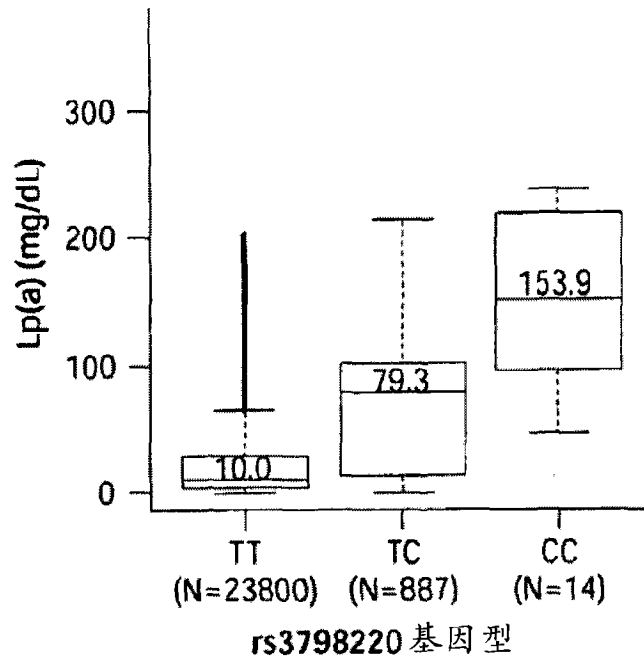


图 1B

WHS, 高加索人
rs3798220=TC

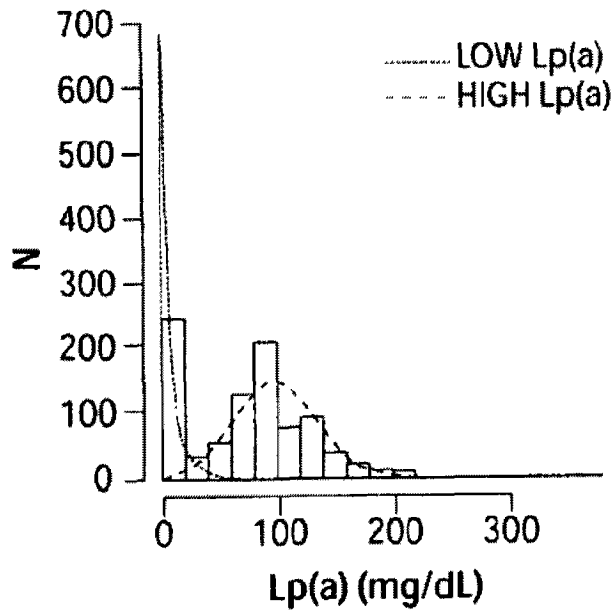


图 1C

PHS, 高加索人
rs3798220=TC

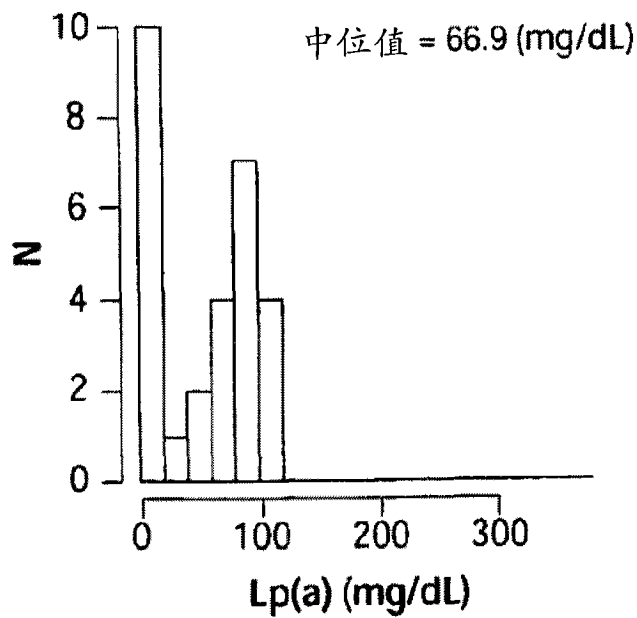


图 1D

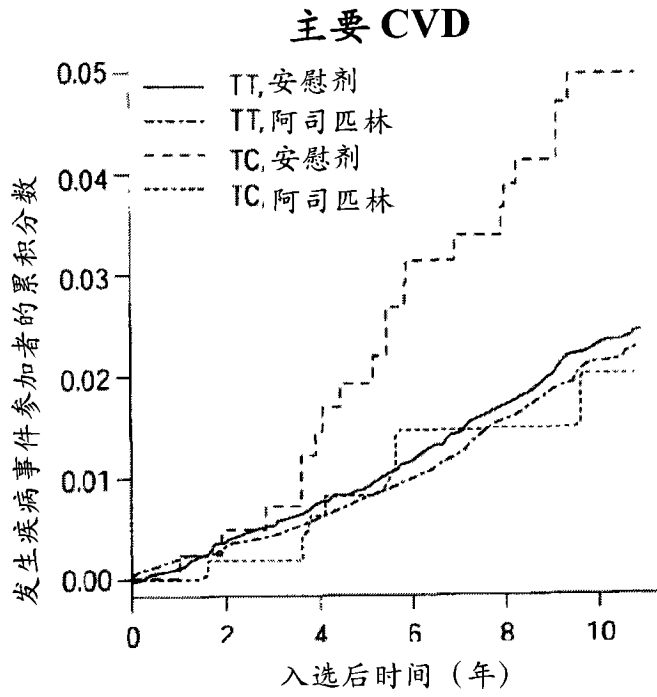


图 2A

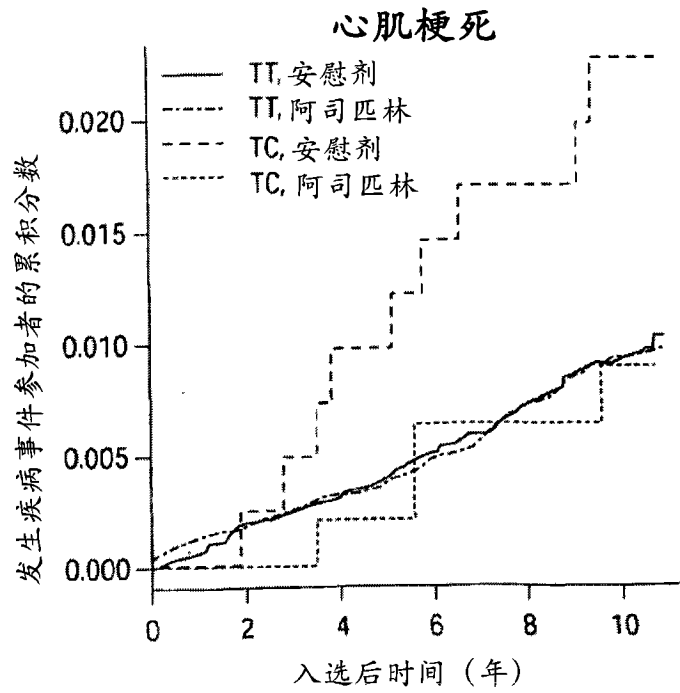


图 2B

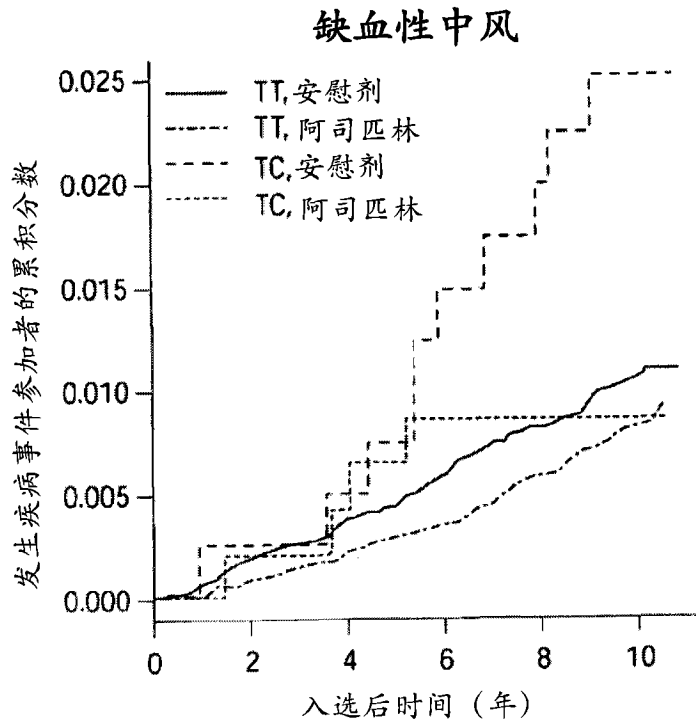


图 2C

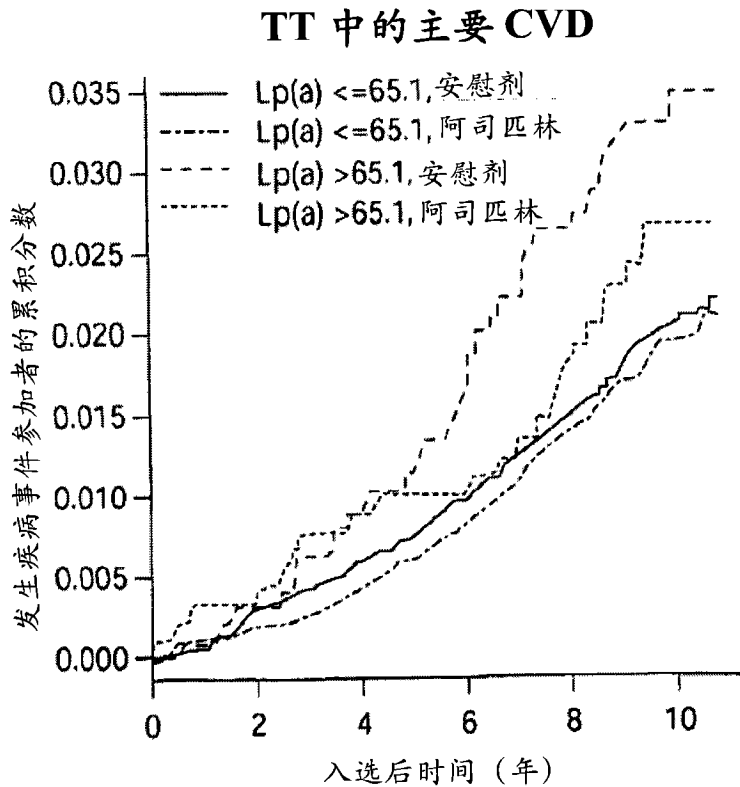


图 2D

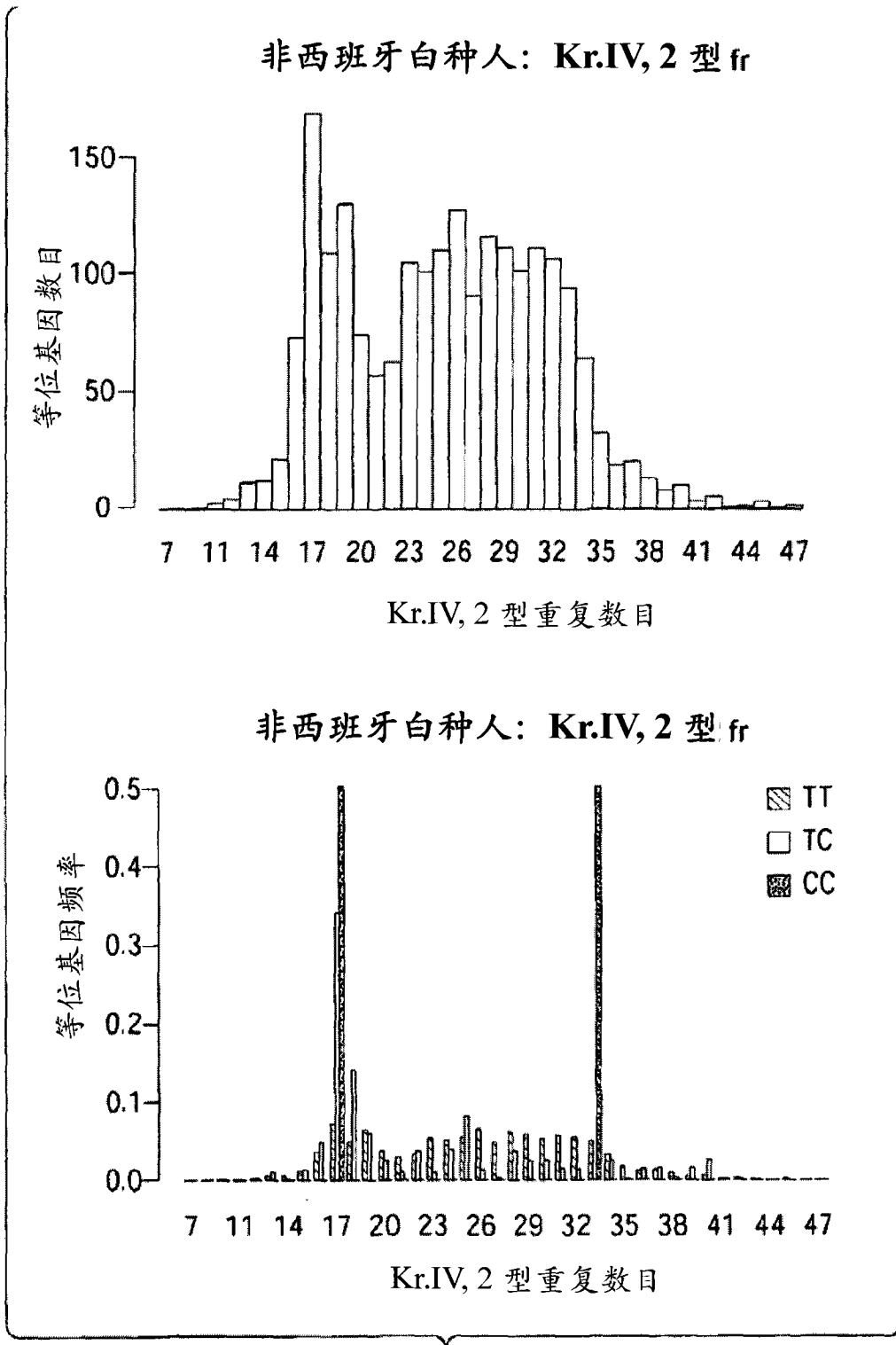


图 3-1

非西班牙白种人: Kr.IV, 2 型数目

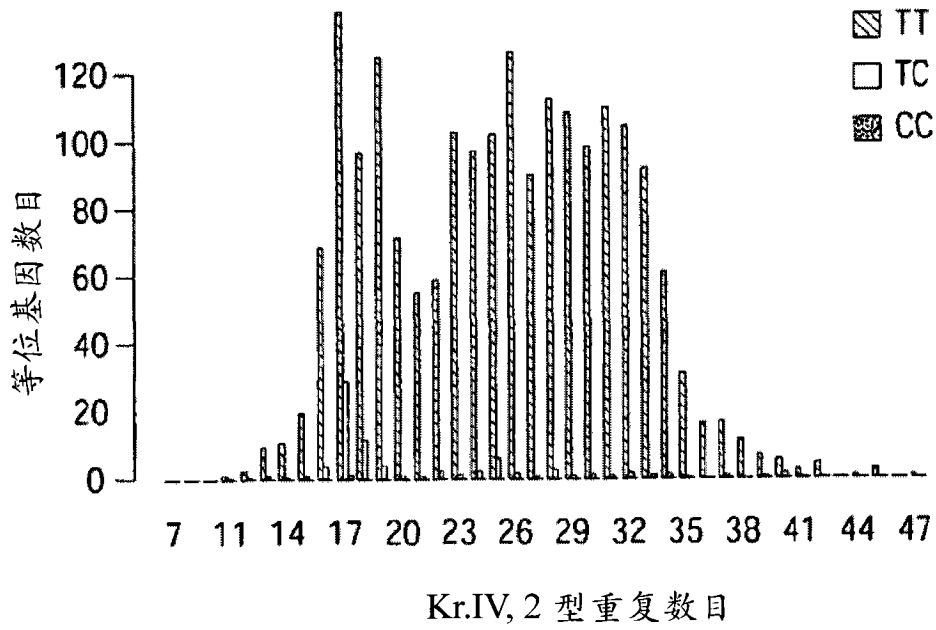


图 3-2

非西班牙白种人

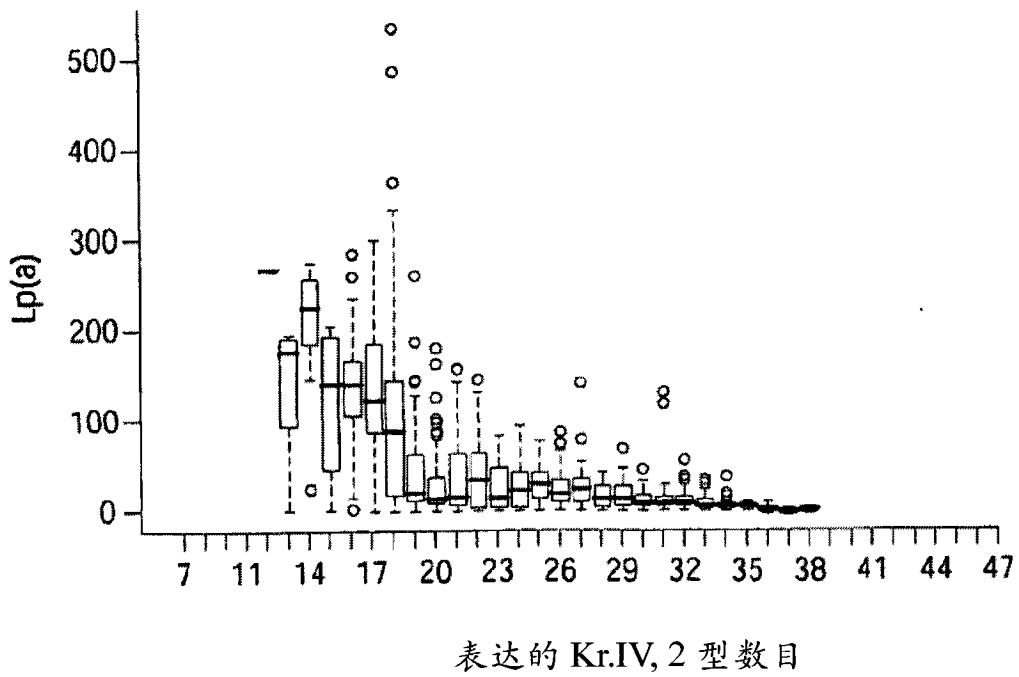


图 4

非西班牙白种人中表达的
KrIV, 2 型=17 的人的 Lp(a)

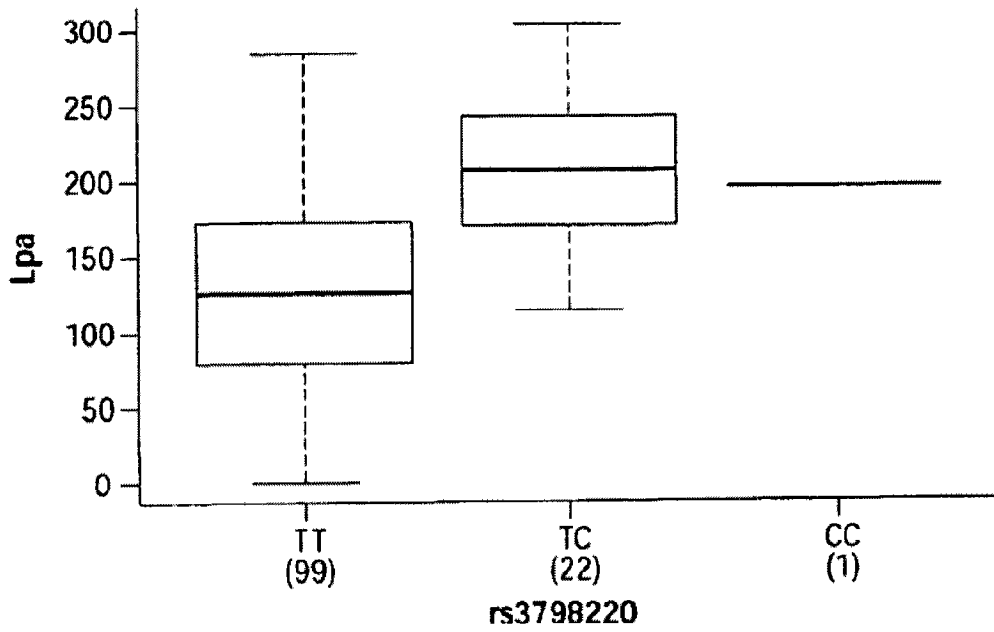


图 5