

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 406**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2017 PCT/EP2017/082157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2018 WO18104545**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2017 E 17825149 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3551762**

54 Título: **Método y kit para predecir el riesgo de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar**

30 Prioridad:

09.12.2016 EP 16203285

30.03.2017 EP 17163894

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

19.05.2022

73 Titular/es:

GENE GENDER S.R.L. (100.0%)

Via Pietro Paleocapa 6

20100 Milano, IT

72 Inventor/es:

TANACKOVIC ABBAS-TERKI, GORANKA;

MICHAUD SCHUTZ, JOËLLE y

PACHE, THIERRY DANIEL

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 911 406 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y kit para predecir el riesgo de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo de la medicina, en particular al campo del pronóstico de enfermedades de la coagulación sanguínea. Específicamente, la presente invención se refiere a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) específicos en el genoma humano, y a su asociación con la trombosis venosa profunda (DVT) y patologías relacionadas, tales como la embolia pulmonar (PE).

Antecedentes de la invención

La trombosis venosa es una afección médica grave que se produce cuando se forma un coágulo sanguíneo (trombo) en una o más venas del cuerpo. Una forma particular de la trombosis venosa se denomina trombosis venosa profunda (DVT) cuando el coágulo sanguíneo se produce en las venas profundas. Tales coágulos sanguíneos pueden desplazarse a través del torrente circulatorio y alojarse en los pulmones, donde pueden bloquear el flujo sanguíneo, provocando embolia pulmonar (PE).

La trombosis venosa es una enfermedad multifactorial compleja, en la que varias afecciones hereditarias o adquiridas pueden aumentar la capacidad de coagulación de la sangre y, por tanto, la tendencia a desarrollar coágulos sanguíneos. Las afecciones hereditarias incluyen mutaciones en los diversos genes de factores de coagulación, anticoagulantes o trombolíticos bien conocidos, tales como el gen del *factor V de Leiden*, y el gen del *factor de protrombina II*. Pueden estar presentes mutaciones adicionales en genes que codifican para las proteínas C y S, que aunque aumentan significativamente el riesgo de desarrollar trombosis venosa, son poco frecuentes y la mayoría de ellas prácticamente de carácter individual. Otras causas posiblemente hereditarias incluyen un posible aumento en la expresión de factores procoagulantes tales como el factor VIII, el factor de von Willebrand y los factores IX y XI (Cushman M., (2005), *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 452-457). Además, se demostró que los grupos sanguíneos ABO distintos de O, con excepción del grupo A2, aumentan el riesgo de desarrollar trombosis, así como algunas variantes genéticas adicionales en los genes tales como *FGG*, *GP6*, *KNG1*, *PROCR*, *SLC44A2*, *STXBP5* y *TSPAN15* se asociaron con un riesgo aumentado de trombosis venosa (Morange P-E., Suchon P. y Trégouët D-A., (2015), *Thrombosis and Haemostasis* 114 (5): 910-919). Los ejemplos de las afecciones adquiridas que pueden provocar DVT son cirugía y traumatismo, inmovilización prolongada, cáncer, trastornos mieloproliferativos e incluso el embarazo y el posparto (Seligsohn U. y Lubetsky A., (2001) *New Eng J Med* 344(16): 1222-1231). Por tanto, puede producirse DVT como resultado de una mutación genética sola o conjuntamente con factores ambientales y de comportamiento, tales como inmovilización prolongada, tabaquismo y tratamientos hormonales (por ejemplo, el uso de anticonceptivos hormonales o terapia de reemplazo hormonal para la menopausia).

Se produce trombosis venosa en 1-2 de cada 1000 individuos al año. La incidencia aumenta con la edad, desde 1 en 100.000 en niños hasta 1 en 10.000 individuos en edad de procrear y 1 en 1.000 individuos en la edad de 50 a 60 años (Rosendaal F. R., (2016), *Thromb J* 14 (Supl. 1): 117-121). Tal como se ha mencionado, se demostraron numerosas afecciones hereditarias y adquiridas en relación con un aumento del riesgo de desarrollar DVT; no obstante, la evidencia ampliamente aceptada de anomalías hemostáticas asociadas con la trombofilia incluye los siguientes parámetros: deficiencia de antitrombina, deficiencia de proteína S, deficiencia de proteína C, mutación del factor V de Leiden, mutación *G20210A* de protrombina, grupos sanguíneos ABO distintos de O, niveles altos del factor VIII, disfibrinogenemia e hiperhomocisteinemia (Franchini M., Martinelli I. y Mannucci P. M., (2016), *Thrombosis and Haemostasis* 115: 25-30). Estos parámetros también se incluyen en las pruebas de trombofilia convencionales, que por tanto incluyen solo pocos marcadores genéticos (la mutación del factor de V de Leiden, la mutación *G20210A* de protrombina y en última instancia grupos sanguíneos distintos de O).

Más de 100 millones de mujeres en todo el mundo usan anticonceptivos estroprogestativos combinados (CC), debido a su altísima eficacia en la reducción del riesgo de embarazo no deseado y a su efecto beneficioso sobre diversos síntomas relacionados con el ciclo de la mujer. No obstante, estos anticonceptivos también aumentan sustancialmente el riesgo de coagulación de la sangre, lo que en última instancia puede conducir a DVT y PE (Vinogradova Y., Coupland C. y Hippisley-Cox J., (2015) *BMJ* 350: h2135). Las generaciones más nuevas de CC, los denominados CC de 3.^a y 4.^a generación, habitualmente se toleran mejor por las mujeres, pero, lo que es más importante, aumentan el riesgo de desarrollar DVT incluso más que las preparaciones más antiguas de las denominadas 2.^a y 1.^a generación.

La incidencia de trombosis entre las usuarias de CC es de alrededor de un 1% o 10 veces más que en la población en general de la misma edad. Solo en Francia, donde más de 3 millones de mujeres de entre 15 y 49 años usan CC, la Agencia Nacional para la Seguridad de Medicamentos y Productos Sanitarios notifica cada año más de 2500 casos de DVT, 850 casos de PE y 20 casos de muerte relacionados con píldoras anticonceptivas. Según estimaciones recientes, en Europa se producen cada año 22.000 casos de DVT relacionados con CC. Por tanto, uno de los principales desafíos para los profesionales sanitarios es identificar a las mujeres en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea relacionada con CC, tal como DVT y PE, y aconsejarlas sobre métodos anticonceptivos alternativos.

Como normas asistenciales actualmente, los médicos prescriptores usan un cuestionario médico para evaluar el riesgo de trombosis, centrándose principalmente en la edad, el índice de masa corporal y el tabaquismo que son factores de riesgo conocidos para el desarrollo de la enfermedad, así como en los antecedentes personales y familiares de DVT o enfermedades relacionadas. Si los antecedentes familiares o personales de trombosis son positivos, los médicos pueden usar la prueba de laboratorio de primer nivel para el examen de trombofilia que incluye el análisis de solo 2 factores de riesgo genéticos: el *factor V de Leiden* y la mutación de *protrombina*; en última instancia, algunos laboratorios también incluyen pruebas genéticas que permiten evaluar los grupos sanguíneos ABO. Aunque estos factores genéticos son factores de riesgo bien establecidos para el desarrollo de trombosis, explican menos de un tercio del riesgo hereditario de desarrollar trombosis. Precisamente, el *factor V de Leiden* está presente en el 20% de los pacientes que desarrollan trombosis, mientras que sólo el 6% de los pacientes portan la mutación de *protrombina* (Rosendaal FR y Reitsma P.H., (2009); Journal of Thrombosis and Haemostasis 7 (1): 301-304). La presencia del grupo sanguíneo ABO distinto de 0, con excepción del grupo sanguíneo A2, aumenta el riesgo de desarrollar trombosis, pero se demostró como un factor de riesgo particularmente importante cuando se combina con la mutación del *factor V de Leiden* debido a un efecto aditivo (Franchini M. y Mannucci P. M., (2014), Thrombosis and Haemostasis 112(6): 1103-1109).

Teniendo en cuenta el número actualmente registrado de casos de trombosis relacionados con CC, así como la pequeña proporción de pacientes con trombosis que son portadores de las variantes genéticas incluidas en las pruebas convencionales, este enfoque tiene un rendimiento relativamente bajo, con sensibilidad y especificidad subóptimas. Esta observación se confirma adicionalmente a través de diversos estudios que demuestran que estas informaciones, en particular los antecedentes familiares, son insuficientes para estimar de manera fiable el riesgo de DVT (de Haan H.G. *et al.*, (2012), Blood 120: 656-663; Suchon P, *et al.*, (2015), Thrombosis and Haemostasis 114(6)).

Para las mujeres en el período de menopausia, la terapia de reemplazo hormonal (TRH) tiene como objetivo prevenir las molestias provocadas por la disminución de las hormonas estrógeno y progesterona circulantes en el cuerpo de la mujer, o en el caso de las mujeres con menopausia prematura o quirúrgica, tiene como objetivo prolongar la vida y reducir la aparición de osteoporosis y demencia. Implica el uso de preparados que habitualmente incluyen estrógenos y progesterona o progestágenos. Como en el caso de los tratamientos anticonceptivos, estas hormonas y, en consecuencia, los tratamientos de reemplazo aumentan de manera importante el riesgo de desarrollar DVT y PE. Ahora está bien establecido que la presencia de la mutación del factor V de Leiden y la mutación de *protrombina* tiene un efecto multiplicador sobre el riesgo global de DVT relacionado con la terapia de reemplazo hormonal. Douketis J.D. *et al.*, (2011), Clin Appl Thromb Hemost. 17(6): E106-113; Botto N., *et al.*, (2011), Climateric. 14(1): 25-30).

Los métodos de epidemiología genética estiman que la heredabilidad de la DVT es de alrededor del 50% (Morange P-E., Suchon P. y Trégouët D-A., (2015), Thrombosis and Haemostasis 114 (5): 910-919). Por tanto, considerando la incidencia de DVT y PE en seres humanos, existe una gran necesidad de identificar nuevos factores genéticos implicados en el riesgo de desarrollar enfermedades de la coagulación sanguínea.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

La invención también proporciona un kit para su uso en dicho método de pronóstico, que comprende

i) sondas específicas para detectar polimorfismos de un solo nucleótido seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2); y opcionalmente

ii) instrucciones para su uso.

También se da a conocer un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo la identificación de si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) novedosos y combinaciones únicas de tales SNP en un sujeto o paciente, así como a la combinación de SNP y factores de riesgo clínico que están asociados con un riesgo de desarrollar enfermedades de la coagulación sanguínea.

En particular, la presente invención proporciona un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo

de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que consisten en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

- 5 Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

El término “comprender” se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de uno o más componentes o características.

- 10 Tal como se usa en el presente documento el término “sujeto” o “paciente” se usa indistintamente en el presente documento para referirse a seres humanos, tanto jóvenes como ancianos, de ambos sexos. El término no indica una edad particular. Por ejemplo, el sujeto está sano o es un sujeto que necesita un tratamiento o que tiene una enfermedad o trastorno. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano que experimenta un cambio en los niveles hormonales. Más
15 preferiblemente, dicho sujeto es una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales. En otra realización, el sujeto es una mujer que experimenta un cambio en los niveles de hormonas femeninas particulares, o bien inducido por cualquier tratamiento que implica hormonas y/o bien por cualquier cambio particular que se produce de manera natural en la vida de una mujer que modifique los niveles hormonales. En particular, los tratamientos incluyen anticonceptivos, anticonceptivos combinados, anticonceptivos de progestágeno solo, terapia de reemplazo hormonal, tecnología de reproducción asistida y cambios que se producen de manera natural en la vida de una mujer tal como
20 por ejemplo los periodos de embarazo y posparto.

“Anticonceptivo combinado” se refiere a cualquier anticonceptivo que contenga un estrógeno combinado con un progestágeno.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “enfermedad de la coagulación sanguínea” se refiere a enfermedades seleccionadas del grupo que comprende trombosis venosa, trombosis venosa profunda (DVT), embolia pulmonar (PE) y trombosis arterial.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término “en riesgo”, cuando se usa con respecto a desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, se refiere a un sujeto que está más predispuesto y es más probable que desarrolle una enfermedad de la coagulación sanguínea que un sujeto que no está “en riesgo”.

- También se da a conocer un método de pronóstico para identificar si un sujeto que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido que consisten en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

- 40 Preferiblemente, la presente invención proporciona un método de pronóstico para identificar si un sujeto que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

- También se da a conocer un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que consisten en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), en el que dicho método comprende además determinar el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).

- También se da a conocer un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), en el que dicho método comprende además determinar el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) seleccionados del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).

- 60 En una realización particular, el sujeto es una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.

- Por tanto, según una realización, la descripción se refiere a un método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicha mujer, el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

También se da a conocer un método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicha mujer, el genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

Tal como se usa en el presente documento, el “valor de p” determina la significación estadística del método de pronóstico de la invención que comprende determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2). Un valor de p pequeño (normalmente $\leq 0,05$) indica fuerte evidencia de la asociación de rs1799853 y rs4379368 con enfermedades de la coagulación sanguínea tales como DVT y/o PE.

Tal como se muestra en el ejemplo 1, la determinación del genotipo de rs1799853 y rs4379368 proporciona evidencia estadísticamente significativa de la asociación con enfermedades de la coagulación sanguínea, en particular DVT y/o PE con un valor de p de 5.10^{-4} y $3,6.10^{-2}$ respectivamente (ejemplo 1, tabla 6).

Se establece una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) y mide lo bien que los diferentes modelos distinguen al sujeto en riesgo del sujeto sin riesgo. La tasa de verdaderos positivos (TPR) se representa gráficamente frente a la tasa de falsos positivos (FPR) en diversos ajustes de umbral (Fawcett T., (2006), Pattern Recognition Letters., 27: 861-874). La precisión se mide por el área bajo la curva (“AUC”) ROC.

Tal como se usa en el presente documento, el “AUC” (área bajo la curva) define la probabilidad de que una prueba positiva se clasifique superior a una prueba negativa con el fin de distinguir entre el sujeto en riesgo y sin riesgo. El AUC oscila entre 0,5 (50% - valor predictivo) y 1 (100% - distinción perfecta; Fawcett T., (2006), Pattern Recognition Letters., 27: 861-874).

Tal como se muestra en el ejemplo 1, la determinación del genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) mejora el rendimiento del método de pronóstico para determinar mujeres en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea en comparación con las pruebas genéticas convencionales de rs6025 (SEQ ID N.º: 3) y rs1799963 (SEQ ID N.º: 4). El valor de AUC aumenta desde 0,6 hasta 0,63 (rs1799853; SEQ ID N.º: 1) o desde 0,6 hasta 0,62 (rs4379368; SEQ ID N.º: 2) (tabla 7).

Preferiblemente, dicho método comprende determinar en una muestra de dicha mujer el genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

Tal como se muestra en el ejemplo 1, la determinación del genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) mejora adicionalmente el rendimiento del método de pronóstico en comparación con las pruebas genéticas convencionales de rs6025 (SEQ ID N.º: 3) y rs1799963 (SEQ ID N.º: 4). El valor de AUC aumenta desde 0,6 hasta 0,64 (rs1799853 y rs4379368) (tabla 7).

En otra realización, se da a conocer un método de pronóstico para identificar si un sujeto que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, en el que el método comprende determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), en el que dicho método comprende además determinar el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).

Preferiblemente, el sujeto es una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.

Tal como se muestra en el ejemplo 1, la determinación del genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1), rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9) mejora además el método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. El valor de AUC aumenta desde 0,6 hasta 0,7 (tabla 7).

La determinación del genotipo de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) realizada además de la determinación del genotipo de una combinación de SNP que consisten en rs6025, rs1799963, rs8176719, rs2066865 y rs2036914 (DeHaan HG., 2012) mejora el método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. El AUC aumenta desde 0,628 hasta 0,641 (ejemplo 1, tabla 8).

Existen diversas formas de variaciones en una secuencia de ADN. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son los más comunes, representando más del 90% de todas las diferencias entre individuos. Precisamente, un SNP es una variación del ADN que se produce comúnmente (por ejemplo, con una frecuencia mayor del 1%) en la que dos cromosomas difieren en un segmento dado en una sola posición (un solo par de bases). Aunque los SNP son variaciones que se produce de manera natural y común en el ADN humano, si forman parte de las secuencias de ADN codificantes o reguladoras, podrían alterar realmente la expresión de los genes o la estabilidad de sus transcritos y de

ese modo conferir algunas ventajas y riesgos a los portadores. Ahora está bien establecido que estas variantes genéticas comunes o su combinación pueden estar asociadas con algunos rasgos importantes, tales como enfermedades. El experto en la técnica conoce bien los SNP y se describen en particular en la base de datos dbSNP del NCBI. (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/).

5 Tal como se usa en el presente documento, los principales SNP que están relacionados con la invención se describen tal como sigue:

Tabla 1:

10

SEQ ID N.º:	rs	Secuencia	Gen
SEQ ID N.º: 1	rs1799853	GATGGGGAAGAGGAGCA TTGAGGAC[C/T]GTGTTCA AGAGGAAGCCCGCTGCCT	Gen de <i>CYP2C9</i> (NG_008385)
SEQ ID N.º: 2	rs4379368	TGGATGGTATTGACTTTTA CATCAC[C/T]GAAGGTGTT TCCATAGATGGAAGAC	Gen de <i>SUGCT</i> (NG_023422)
SEQ ID N.º: 3	rs6025	TGTAAGAGCAGATCCCTG GACAGGC[A/G]AGGAATA CAGGTATTTTGTCTTGA	Gen del <i>factor V</i> (NG_011806)
SEQ ID N.º: 4	rs1799963	GTTCCCAATAAAAGTGAC TCTCAGY[A/G]AGCCTCAA TGCTCCCAGTGCTATTC	Gen del <i>factor II</i> (NG_008953)
SEQ ID N.º: 5	rs8176719	GCAGTAGGAAGGATGTCC TCGTGGT[- /G]ACCCCTTGGCTGGCTC CCATTGTCT	Gen de <i>ABO</i> (NG_006669)
SEQ ID N.º: 6	rs8176750	CCAAGAACCACCAGGCGG TCCGGAA[- /C]CCGTGAGCGGCTGCCA GGGCTCTG	Gen de <i>ABO</i> (NG_006669)
SEQ ID N.º: 7	rs9574	GCGATGTTAATTACTCTCC AGCCCC[C/G]TCAGAAGG GGCTGGATTGATGGAGG	Gen de <i>PROCR</i> (NG_032899)
SEQ ID N.º: 8	rs2289252	GTGAGGGTGAGGCTTGTC TCTCTCT[C/T]GCCCTCTCA TCCTGGCACATGTGCG	Gen del <i>factor 11</i> (NG_008051)
SEQ ID N.º: 9	rs710446	AGGGATCCAATCGTCATC ACTCTGT[A/G]TGGGAGCT GGTGATATAGGAGGCAT	Gen de <i>KNG1</i> (NG_016009)

En los métodos de pronóstico, el genotipo de los SNP se determina mediante secuenciación de ácidos nucleicos y/o mediante análisis de PCR en una muestra del sujeto, preferiblemente una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.

15

La muestra puede ser cualquier muestra biológica, que contenga ADN y que se derive del sujeto. Esto incluye fluidos corporales, tejidos, células, biopsias, etc. Las muestras preferidas son saliva y sangre.

20

La muestra se recoge según el método de transferencia elegido y se trata para purificar ácidos nucleicos. Estos tratamientos incluyen etapas de lisis, centrifugación y lavado. La lisis incluye enfoques mecánicos, físicos o químicos. El ácido nucleico purificado se usa entonces para genotipar los SNP anteriores. El ácido nucleico se añade a un tampón, enzimas, sondas y/o cebadores específicos. Esto puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado, tal como un tubo, una placa, un pocillo, vidrio, etc. El genotipo de los SNP anteriores puede detectarse mediante diversos métodos, incluyendo PCR, RFLP, PCR específica de alelo, PCR cuantitativa, secuenciación, micromatrices e

hibridación.

La secuenciación puede realizarse mediante el uso de secuenciadores automáticos usando diversas técnicas y siguiendo protocolos del estado de la técnica. Las reacciones de secuenciación pueden realizarse sobre genes completos o sobre regiones específicas que cubren los SNP. Para la secuenciación convencional, la reacción requiere un trozo de ADN que inicia la reacción de amplificación, nucleótidos convencionales y nucleótidos modificados que bloquean la reacción de amplificación. Puede realizarse secuenciación de última generación mediante diversas técnicas que amplifican masivamente regiones de ADN.

La amplificación puede realizarse usando numerosas técnicas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR específica de alelo (ASA-PCR), PCR seguida de digestión con enzimas de restricción (RFLP-PCR) y PCR cuantitativa. Estas técnicas se basan en la amplificación de regiones específicas usando pequeños trozos de ADN que se hibridan con las regiones específicas e inician la reacción de amplificación. La reacción también requiere componentes necesarios para que la amplificación funcione, tales como nucleótidos y enzimas. En el caso de ASA-PCR, se usa una reacción múltiple o reacciones independientes mezclando 4 trozos de ADN que iniciarán la reacción de amplificación. Entre estos 4 trozos de ADN, 2 son específicos para el SNP; uno será específico para el alelo con efecto y el otro será específico para el alelo sin efecto. Los tamaños de las regiones amplificadas serán diferentes para poder distinguirlos en un gel de agarosa normal. En el caso de RFLP-PCR, el material amplificado se trata usando una enzima de restricción para cortar la región amplificada según el alelo con SNP. Por ejemplo, la enzima A cortaría el alelo con efecto, mientras que no cortaría el alelo sin efecto. Los tamaños de la región amplificada digerida se distinguen en un gel de agarosa normal. Para la PCR cuantitativa, se añaden sondas marcadas específicas para cada alelo a la reacción de amplificación para distinguir entre los dos alelos.

El genotipado también puede realizarse usando técnicas de hibridación sobre un soporte sólido o en suspensión. Estas técnicas se basan en la hibridación del material amplificado con sondas y cebadores específicos de alelo sobre un soporte. El material amplificado se marca para distinguir los diferentes alelos.

El término "alelo con efecto" según la invención se refiere al alelo que confiere el riesgo y/o el efecto protector para desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea a un sujeto, preferiblemente una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales. El término "alelo con efecto" se refiere por tanto a un SNP o alelo que está asociado con un alto riesgo relativo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.

El término "alelo sin efecto" se refiere al alelo que no confiere un riesgo ni un efecto protector para desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea a un sujeto, preferiblemente una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.

En el contexto de la invención, se realizan métodos de pronóstico para determinar la presencia o ausencia de formas homocigotas o heterocigotas de al menos un "alelo con efecto". Los datos de genotipado incluyen tres posibilidades, que son homocigoto para el "alelo con efecto", heterocigoto u homocigoto para el "alelo sin efecto".

La tabla 2 proporciona los genotipos detallados para cada SNP (A: adenina, G: guanina, C: citosina, T: timina, -: deleción).

Tabla 2:

	Genotipo		
SNP	Homocigoto para el "alelo con efecto"	Heterocigoto	Homocigoto para el "alelo sin efecto"
rs1799853	(T;T)	(C;T)	(C;C)
rs4379368	(T;T)	(C;T)	(C;C)
rs6025	(A;A)	(A;G)	(G;G)
rs1799963	(A;A)	(A;G)	(G;G)
rs8176719	(G;G)	(-;G)	(-;-)
rs8176750	(-;-)	(-;C)	(C;C)
rs9574	(G;G)	(C;G)	(C;C)
rs2289252	(T;T)	(C;T)	(C;C)
rs710446	(G;G)	(A;G)	(A;A)

En los métodos de pronóstico, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota indica que dicho sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.

En comparación, la presencia del alelo C en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o del alelo C en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma homocigota indica que dicho sujeto no tiene un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la

coagulación sanguínea.

Tal como se muestra en los ejemplos, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) en forma heterocigota u homocigota en los pacientes 11-14 y 31-32 indica que estos pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. De manera similar, la presencia del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota en los pacientes 15-17 indica que estos pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. De hecho, todos estos pacientes han desarrollado DVT o PE (ejemplos 2-3, tablas 9 y 11). Preferiblemente, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota indica que dicho sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.

Tal como se muestra en los ejemplos, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota en los pacientes 18-24 y 33-36 indica que estos pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. Todos estos pacientes han desarrollado DVT o PE. En cambio, los pacientes 1-10 y 25-30 con el alelo C en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y el alelo C en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma homocigota no han desarrollado una enfermedad de la coagulación sanguínea (ejemplos 2-3, tablas 9 y 11).

Más preferiblemente, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) y un alelo en forma heterocigota u homocigota en al menos un SNP seleccionado del grupo que comprende el alelo A en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), el alelo A en rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), el alelo G en rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), el alelo (-) en rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), el alelo G en rs9574 (SEQ ID N.º: 7), el alelo T en rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y el alelo G en rs710446 (SEQ ID N.º: 9), indican que dicho sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.

Tal como se muestra en el ejemplo 4, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota junto con al menos un SNP seleccionado del grupo que comprende el alelo A en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), el alelo A en rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), el alelo G en rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), el alelo (-) en rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), el alelo G en rs9574 (SEQ ID N.º: 7), el alelo T en rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y el alelo G en rs710446 (SEQ ID N.º: 9), en los pacientes 44-51 indican que estos pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. Todos estos pacientes han desarrollado DVT o PE. En cambio, los pacientes 37-43 con el alelo C en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o del alelo C en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma homocigota no han desarrollado una enfermedad de la coagulación sanguínea (tabla 2 y ejemplo 4, tabla 12).

También se da a conocer un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método las etapas de:

a) determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2); y

b) determinar los factores de riesgo clínico de dicho sujeto.

Tal como se muestra en el ejemplo 5, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota junto con factores de riesgo clínico seleccionados del grupo que comprende el tabaquismo, el IMC, la edad, los antecedentes familiares de enfermedades de la coagulación sanguínea y/o el cambio en los niveles hormonales, en los pacientes 58-63 indican que estos pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. Todos estos pacientes han desarrollado DVT o PE. En cambio, los pacientes 52-57 con el alelo C en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y el alelo C en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma homocigota no han desarrollado una enfermedad de la coagulación sanguínea (tabla 2 y ejemplo 5, tabla 13).

También se da a conocer un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método las etapas de:

a) determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2);

b) determinar en dicha muestra el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que comprende rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9); y

c) determinar los factores de riesgo clínico de dicho sujeto.

Preferiblemente, el sujeto es una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.

Tal como se muestra en el ejemplo 6, la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y del alelo T en rs4379368

(SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota y al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que comprende rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9), junto con factores de riesgo clínico seleccionados del grupo que comprende el tabaquismo, el IMC, la edad, los antecedentes familiares de enfermedades de la coagulación sanguínea y/o el cambio en los niveles hormonales, en los pacientes 64-74 indican que estos pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. Todos estos pacientes han desarrollado DVT o PE. En cambio, los pacientes 75-81 con el alelo C en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y el alelo C en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma homocigota no han desarrollado una enfermedad de la coagulación sanguínea (tabla 14, ejemplo 6).

Se seleccionan factores de riesgo clínico, por ejemplo, del grupo que comprende el tabaquismo, el IMC, la edad, los antecedentes familiares de enfermedades de la coagulación sanguínea, el cambio en los niveles hormonales, los antecedentes personales de enfermedades de la coagulación sanguínea, el alcoholismo, antecedentes personales de hipertensión, de colesterol, de diabetes, de enfermedad autoinmunitaria, de cáncer y de otras enfermedades cardiovasculares, antecedentes de anticoncepción, la duración de la anticoncepción y el uso concomitante de otros fármacos. Por ejemplo, los factores de riesgo clínico pueden determinarse a través del formulario de solicitud enviado por el médico o profesional sanitario.

Preferiblemente, los factores de riesgo clínico se seleccionan del grupo que comprende el tabaquismo, el IMC, la edad, los antecedentes familiares de enfermedades de la coagulación sanguínea y/o el cambio en los niveles hormonales.

La descripción también se refiere a métodos de pronóstico tal como se describió anteriormente, en los que dicha mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está tomando un anticonceptivo, un anticonceptivo combinado, una terapia de reemplazo hormonal, un anticonceptivo de progestágeno solo, está embarazada, está recibiendo tecnología de reproducción asistida o está en periodo posparto.

El tipo de hormona presente en el tratamiento del sujeto incluye los progestágenos levonorgestrel, norgestimato, gestodeno, desogestrel, drospirenona, dienogest, acetato de ciproterona, en particular pero no exclusivamente y también los estrógenos estradiol, etinilestradiol, acetato de estradiol, cipionato de estradiol, valerato de estradiol, enantato de estradiol, benzoato de estradiol, estradiol hemihidratado, en particular pero no exclusivamente. También incluye píldoras de progestágeno solo, dispositivos intrauterinos y terapia de reemplazo hormonal según la vía de administración tal como parche oral o transdérmico y otra terapia tal como Livial® (Tibolone).

En los métodos de pronóstico dados a conocer en el presente documento, las enfermedades de la coagulación sanguínea se seleccionan del grupo que comprende trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, trombosis venosa y trombosis arterial.

Preferiblemente, la presente descripción proporciona métodos de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una trombosis venosa profunda y/o una embolia pulmonar.

La invención proporciona además un kit para su uso en el método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea descrita anteriormente, que consiste en:

i) sondas específicas para detectar SNP que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2); y opcionalmente

ii) instrucciones para su uso.

En una realización independiente, un kit para su uso en los métodos de pronóstico descritos anteriormente consiste en:

i) sondas específicas para detectar SNP seleccionado del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8), rs710446 (SEQ ID N.º: 9), rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) y rs1799853 (SEQ ID N.º: 1); y opcionalmente

ii) instrucciones para su uso.

En particular, el kit contiene los componentes necesarios para genotipar los SNP seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1), rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9). Estos componentes incluyen sondas y cebadores específicos para cada SNP. Los cebadores son necesarios para iniciar la amplificación de cada región específica correspondiente a cada SNP. Las sondas se hibridan específicamente con cada alelo de cada SNP y permiten la detección de cada alelo. Las sondas para cada alelo pueden marcarse con diferentes fluoróforos para permitir una detección diferenciada. El kit también puede contener un soporte sólido para hibridarse con material amplificado y permitir la detección de cada alelo sobre el soporte sólido

después de la reacción de marcaje. El kit también puede contener los reactivos necesarios para secuenciar las regiones alrededor de los 9 SNP enumerados anteriormente o los genes completos correspondientes.

5 Estos reactivos incluyen cebadores específicos para cada cebador que permitiría iniciar la reacción de amplificación y nucleótidos modificados.

10 Preferiblemente, el reactivo de detección de SNP es un cebador o sonda de oligonucleótido de ADN aislado o sintético, o un cebador u oligonucleótido de ARN o un oligómero de PNA o una combinación de los mismos, que se hibrida con un fragmento de una molécula de ácido nucleico diana que contiene uno de los SNP especificados en una cualquiera de las SEQ ID N.ºs 1 a 9, o un complemento de las mismas.

En particular, dicho reactivo de detección de SNP puede diferenciar entre ácidos nucleicos que tienen un nucleótido particular en una posición de SNP diana.

15 En la presente descripción, las sondas específicas de SNP se hibridan en condiciones rigurosas con al menos 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 120 o más nucleótidos consecutivos en una molécula de ácido nucleico diana que comprende al menos uno de los SNP especificados en una cualquiera de las SEQ ID N.ºs: 1 a 9, o un complemento de las mismas.

20 Preferiblemente, según la descripción, al menos una sonda específica de SNP en el kit es un oligonucleótido que tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos, preferiblemente una longitud de al menos 10, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos.

25 La descripción también se refiere a un kit para su uso, en el que las sondas específicas de SNP son un compuesto que está marcado.

30 También se da a conocer un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

35 Preferiblemente, dicho método comprende además la etapa de determinar el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).

40 Los métodos descritos anteriormente pueden comprender además la etapa de determinar los factores de riesgo clínico de dicho sujeto.

45 En una realización independiente, se da a conocer un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo un método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, en el que el método comprende determinar, en una muestra de dicha mujer, el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).

50 Preferiblemente, dicho método comprende además la etapa de determinar el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).

Los métodos descritos anteriormente pueden comprender además la etapa de determinar los factores de riesgo clínico de dicha mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.

55 Por tanto, también se da a conocer un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo un método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método las etapas de:

60 a) determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2);

65 b) determinar en dicha muestra el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) seleccionado del grupo que comprende rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9); y

c) determinar los factores de riesgo clínico de dicho sujeto.

Pueden determinarse SNP adicionales basándose en los SNP descritos en la presente invención mediante correlación estadística. El "desequilibrio de ligamiento" (LD) se refiere a la correlación estadística entre dos SNP vecinos. El LD generalmente se cuantifica o bien con el parámetro de asociación de Lewontin (Lewontin, RC (1964). Genetics. 49 (1): 49-67) o bien con el parámetro r^2 basado en el coeficiente de correlación de Pearson (Karl Pearson (1895) Proceedings of the Royal Society of London, 58: 240-242). Cuando el valor de LD es igual a 1, los dos SNP están en completo desequilibrio. En cambio, dos SNP con un valor de LD igual a 0 están en equilibrio de ligamiento completo. El desequilibrio de ligamiento se calcula siguiendo la aplicación del algoritmo de maximización de expectativas (EM) para la estimación de frecuencias de haplotipos.

Por tanto, en la presente descripción, los SNP considerados en LD con rs1799853 (SEQ ID N.º: 1), rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) o rs710446 (SEQ ID N.º: 9) son SNP con un r^2 mayor de 0,5.

En otra realización independiente, se da a conocer un método de pronóstico para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, en el que el método comprende:

a) obtener una muestra biológica de un sujeto;

b) determinar a partir de dicha muestra el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2);

c) pronosticar que el sujeto tiene alto riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea cuando se detecta el alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o el alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota; y

d) administrar una cantidad eficaz de un compuesto adaptado a la prevención de una enfermedad de la coagulación sanguínea a dicho sujeto.

Los compuestos adaptados a la prevención de una enfermedad de la coagulación sanguínea se seleccionan del grupo que comprende apixabán, rivaroxabán, dabigatrán, edoxabán, heparina, antagonistas de la vitamina K y fármacos cumarínicos tales como warfarina.

También se da a conocer en el presente documento un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método:

a) obtener una muestra biológica de un sujeto;

b) determinar a partir de dicha muestra el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2);

c) diagnosticar que el sujeto tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea cuando se detecta el alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o el alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota; y

d) administrar una cantidad eficaz de un compuesto adaptado al tratamiento de una enfermedad de la coagulación sanguínea a dicho sujeto.

Los compuestos adaptados al tratamiento de una enfermedad de la coagulación sanguínea se seleccionan del grupo que comprende apixabán, rivaroxabán, dabigatrán, edoxabán, heparina, antagonistas de la vitamina K y fármacos cumarínicos tales como warfarina.

Preferiblemente, el sujeto es una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son ejemplos de métodos de puesta en práctica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo

Ejemplo 1: Rendimiento del método de pronóstico

Características de la población estudiada

Este estudio incluyó sujetos humanos y se llevó a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki; todos los participantes firmaron un consentimiento informado. El estudio incluye 794 casos femeninos que han desarrollado al

menos un episodio de VTE mientras tomaban CC. Estos casos son parte del estudio PIL1 Genetic Risk Monitoring (PILGRIM) descrito anteriormente (Suchon P, *et al.* (2017) Clin Genet; 91(1):131-36), que se refiere al método usado para confirmar la aparición de trombosis. También se incluyeron 828 mujeres de control de diferentes fuentes: 523 son parte del estudio PILGRIM; 174 forman parte del estudio CoLaus (Firman M, *et al.* (2008) BMC Cardiovasc Disord; 8:6), 56 se reclutaron entre 1997 y 1998 en el sur de Francia y los controles restantes se reclutaron entre 2012 y 2016 entre la población suiza. Estas mujeres de control estaban tomando CC pero no habían desarrollado VTE en el momento de la investigación de genotipado.

Entre 1622 mujeres que tomaban una píldora anticonceptiva oral, 794 habían desarrollado un acontecimiento trombótico, o bien una trombosis venosa profunda (DVT) o bien una embolia pulmonar (PE). Se presenta la distribución de edad, el IMC y el tabaquismo en ambas poblaciones (tablas 3 y 4). La distribución de edad es similar en ambos grupos, siendo el IMC y el tabaquismo ligeramente superiores en los casos.

Tabla 3:

Características clínicas	Sujeto (n=794)	Controles (n= 828)
Edad (años)	32,3	31,5
Índice de masa corporal (kg/m ²)	24	22,3
Tabaquismo	260	206

Tabla 4:

	Casos (n)	Controles (n)
Número total	794	828
VTE	794	
DVT	600	
PE	194	
Edad (media)	32	31,5
IMC (media)	24	23
Antecedentes familiares de VTE	222	19
Tabaquismo	260	206

Genotipado

Se identificaron 50 polimorfismos genéticos para las 1622 mujeres del estudio usando la tecnología Veracode-BeadXpress de Illumina. La selección de estos SNP que iban a someterse a prueba se realizó según los metanálisis de la bibliografía existente y los estudios de laboratorio que se realizaron. En más detalles, los SNP se genotiparon usando la tecnología GoldenGate de Illumina y se evaluaron usando el software GenomeStudio V2011.1 y BeadXpress de Illumina. Las agrupaciones para cada SNP se organizaron manualmente y se genotiparon adicionalmente muestras indeterminadas usando secuenciación de Sanger. El SNP rs1053878 se genotipó usando RFLP-PCR; más detalladamente, la región de ADN se amplificó con los siguientes cebadores (directo: 5'-GCCACCGTGTCCACTACTATG-3' e inverso: 5'-GTCCACGCACACCAGGTAAT-3') y los amplicones se digirieron con la enzima de restricción PvuII. Los controles de la cohorte CoLaus se genotiparon previamente tal como se describe (Kutalik Z, *et al.* (2011) Bioestistics; 12(1):1-17). Para los controles de CoLaus, se usaron sustitutos ($r^2 > 85\%$) para 9 SNP (rs4572916 para rs10029715, rs8176704 para rs1053878, rs3736455 para rs13146272, rs6018 para rs1800595, rs4253417 para rs2289252, rs11038993 para rs3136516, rs2169682 para rs7082872, rs687621 para rs8176719 y rs2069952 para rs9574). La calidad de los datos de genotipado se evaluó mediante GenomeStudio y mediante inspección visual. Los datos de genotipado se validaron mediante secuenciación o RFLP-PCR.

Análisis estadísticos

La cohorte se dividió aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento y un conjunto de prueba de igual tamaño. El conjunto de entrenamiento se usó para realizar una selección gradual (AIC, criterio de información de Akaike) y una regresión logística para generar coeficientes. Entonces se aplicó el modelo ajustado al conjunto de datos de prueba para calcular las predicciones. Este proceso se repitió 10.000 veces y se usaron las medianas de los coeficientes. A las variables no seleccionadas en la serie se les asignó un coeficiente nulo.

La razón de probabilidades (OR) cuantifica la asociación entre dos parámetros en una población dada (Cornfield J., (1951). Journal of the National Cancer Institute. 11: 1269-1275). Estos valores se obtienen a partir de modelos matemáticos tales como la regresión logística usada en el presente documento. Una regresión logística es un modelo matemático que mide la relación entre variables al predecir la probabilidad de un resultado dado (Walker, SH; Duncan,

DB (1967). Biometrika. 54: 167-178). La OR y los valores de p son el resultado de la regresión logística y corresponden a la potencia y la significación de la relación medida, respectivamente.

Resultados

Los modelos de regresión logística se ajustaron gradualmente para encontrar el modelo de múltiples variables óptimo en los 10.000 conjuntos de entrenamiento. Al promediar estos 10.000 modelos, se identificaron 9 de los 46 SNP sometidos a prueba que estaban en el modelo promediado y también se asociaron significativamente con el desarrollo de trombosis (tabla 5).

Este enfoque confirmó la asociación entre DVT y/o PE con varios SNP ya descritos en la bibliografía (tabla 5). La tabla incluye la razón de probabilidades (OR) observada en la bibliografía, las referencias bibliográficas y el valor de p obtenido a partir del presente estudio descrito. La razón de probabilidades indica la asociación entre un SNP y el desarrollo de trombosis.

Tabla 5:

SNP	Gen	Alelo sin efecto> alelo con efecto	OR ¹	Referencias ²	Valor de p ³
rs6025 (SEQ ID N.º: 3)	Gen del <i>factor V</i> (NG_011806)	G>A	4,3	De Haan, 2012	8,3 ×10 ⁻¹⁴
rs1799963 (SEQ ID N.º: 4)	Gen del <i>factor II</i> (NG_008953)	G>A	3	De Haan, 2012	3,7×10 ⁻⁸
rs8176719 (SEQ ID N.º: 5)	Gen de <i>ABO</i> (NG_006669)	->G	1,74	De Haan, 2012	6,0×10 ⁻⁷
rs8176750 (SEQ ID N.º: 6)	Gen de <i>ABO</i> (NG_006669)	C>-	1,89-1,91	Tregouet, 2009	2,5×10 ⁻³
rs9574 (SEQ ID N.º: 7)	Gen de <i>PROCR</i> (NG_032899)	C>G	1,18 ⁺	De Haan, 2012	9×10 ⁻⁴
rs2289252 (SEQ ID N.º: 8)	Gen del <i>factor 11</i> (NG_008051)	C>T	1,36	De Haan, 2012	2,9×10 ⁻⁴
rs710446 (SEQ ID N.º: 9)	Gen de <i>KNG1</i> (NG_016009)	A>G	1,196	Morange, 2011	3,8×10 ⁻²
¹ Razón de probabilidades, para la asociación entre el SNP y el desarrollo de trombosis, obtenida a partir de la bibliografía. La mayoría de estas OR se basan en la cohorte MARTHA. ⁺ Esta OR corresponde al SNP rs867186. Tanto rs9574 como rs867186 forman parte del haplotipo A2 y A3 que están asociados con el riesgo de trombosis. ² Referencias para la OR relacionada ³ Valores de p obtenidos a partir de la cohorte de 1622 mujeres y una regresión logística en toda la población					

También se obtuvieron valores de p significativos para dos SNP adicionales que no se asociaron previamente con el desarrollo de acontecimientos tromboembólicos. Estos dos SNP se describen en la tabla 6.

Tabla 6:

SNP	Gen	Alelo sin efecto> alelo con efecto	valor de p ¹	OR ²
rs1799853 (SEQ ID N.º: 1)	Gen de <i>CYP2C9</i> (NG_008385)	C>T	5,0×10 ⁻⁴	1,55
rs4379368 (SEQ ID N.º: 2)	Gen de <i>SUGCT</i> (NG_023422)	C>T	3,6×10 ⁻²	1,35
rs1057910	Gen de <i>CYP2C9</i> (NG_008385)	A>C	>0,05	-
rs35599367	Gen de <i>CYP3A4</i> (NG_008421)	C>T	>0,05	-
¹ Valores de p obtenidos a partir de la cohorte de 1622 mujeres y una regresión logística en toda la población ² Razón de probabilidades obtenida a partir de la de 1622 mujeres y una regresión logística				

Pueden usarse diferentes enfoques para generar valores de p. En las tablas 4 y 5, los valores de p se han determinado a partir de 10.000 repeticiones de una regresión logística usando la población total de 1622 mujeres, mientras que otros enfoques generan valores de p usando una regresión logística solo en la mitad de la población seleccionada aleatoriamente 10.000 veces de manera aparte de la muestra.

rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) está presente en el gen que codifica para el citocromo CYP2C9. Este SNP también se conoce como alelo *2 en la nomenclatura oficial para las enzimas CYP450. Esta variante está asociada con una fuerte

disminución de la actividad de la enzima (Thijssen H.H., (2005), Clin Pharmacol Ther., 74, 61-68). El etinilestradiol, que es el estrógeno presente en la mayoría de los CC, se metaboliza a través de las rutas del CYP450. Están implicados varios de los citocromos, incluyendo CYP2C9 (Lee AJ., (2003), Endocrinology, 144(8):3382-98). Se han sometido a prueba otros SNP asociados con la actividad de varios citocromos implicados en el metabolismo del estrógeno (por ejemplo, rs1057910 y rs35599367, tabla 6). Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de VTE en usuarias de CC. La misma variante genética también se identificó como uno de los factores que dificultan la eliminación de fármacos anticoagulantes derivados de cumarina (Rettie AE., Tai G., (2006), The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. Mol Interv 6: 223 - 227). Las otras variantes genéticas, tales como CYP2C9 *3 (rs1057910, tabla 6) demostraron tener el mismo efecto sobre el metabolismo de los fármacos. Se sometió a prueba CYP2C9 *3, pero no tuvo una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de VTE en usuarias de CC.

rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) está presente en la secuencia génica que codifica para la succinil-CoA:glutarato-CoA transferasa. Inicialmente se encontró que este SNP estaba asociado con migraña (Anttila V., (2013) Nat. Gen., 45(8):912-7). Se han sometido a prueba otros SNP asociados con el desarrollo de migraña (por ejemplo, rs2651899 y rs10915437). Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de VTE en usuarias de CC.

Se estableció la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) y mide lo bien que los diferentes modelos distinguen a las mujeres en riesgo de las mujeres sin riesgo. La tasa de verdaderos positivos (TPR) se representa gráficamente frente a la tasa de falsos positivos (FPR) en diversos ajustes de umbral (Fawcett T., (2006), Pattern Recognition Letters., 27: 861-874).

El área bajo la curva (AUC) es igual a la probabilidad de que una prueba positiva se clasifique superior a una prueba negativa para distinguir a las mujeres en riesgo de las mujeres sin riesgo. El AUC oscila entre 0,5 (50% - valor predictivo) y 1 (100% - distinción perfecta; Fawcett T., (2006), Pattern Recognition Letters., 27: 861-874).

En la tabla 7 se muestra las AUC obtenidas siguiendo la regresión logística descrita en el presente documento y correspondientes a las diferentes combinaciones de SNP. Hay varios modos de calcular las AUC, o bien usando la población total de 1622 mujeres o bien usando solo el conjunto de prueba que corresponde a la mitad de la población que no se usó para seleccionar variables. Las AUC presentadas en la tabla 7 se han calculado usando la población total de 1622 mujeres.

Tabla 7:

rs y SEQ ID N.º:	AUC
rs6025 (SEQ ID N.º: 3) rs1799963 (SEQ ID N.º: 4)	0,60
rs6025 (SEQ ID N.º: 3) rs1799963 (SEQ ID N.º: 4) rs1799853 (SEQ ID N.º: 1)	0,63
rs6025 (SEQ ID N.º: 3) rs1799963 (SEQ ID N.º: 4) rs4379368 (SEQ ID N.º: 2)	0,62
rs6025 (SEQ ID N.º: 3) rs1799963 (SEQ ID N.º: 4) rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) rs4379368 (SEQ ID N.º: 2)	0,64
rs6025 (SEQ ID N.º: 3) rs1799963 (SEQ ID N.º: 4) rs8176719 (SEQ ID N.º: 5) rs8176750 (SEQ ID N.º: 6) rs9574 (SEQ ID N.º: 7) rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) rs710446 (SEQ ID N.º: 9) rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) rs1799853 (SEQ ID N.º: 1)	0,70

Los valores de las AUC demuestran que pueden usarse rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) y/o rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) en un método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea. La determinación de o bien rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), o rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) o bien ambos, mejora el rendimiento de detección de mujeres en riesgo en comparación con las pruebas genéticas convencionales (rs6025 (SEQ ID N.º: 3) y rs1799963 (SEQ ID N.º: 4)).

Además de rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) y/o rs1799853 (SEQ ID N.º: 1), someter a prueba rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8), rs710446 (SEQ ID N.º: 9) mejora adicionalmente el método de pronóstico para identificar si una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.

De manera similar, la adición de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) a la combinación notificada anteriormente de SNP para identificar el riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea (DeHaan HG., (2012), Blood, 120:656-663) aumenta el AUC cuando se calcula usando la población total de 1622 mujeres. La combinación de los 5 SNP notificados por DeHaan (rs6025, rs1799963, rs8176719, rs2066865 y rs2036914) alcanza un AUC de 0,628 (tabla 8, DeHaan). Este AUC se mejora cuando se añade rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) o ambos.

Tabla 8:

rs y SEQ ID N.º:	AUC
rs6025, rs1799963, rs8176719, rs2066865 y rs2036914	0,628
rs6025, rs1799963, rs8176719, rs2066865 y rs2036914 + SEQ ID N.º: 1	0,636
rs6025, rs1799963, rs8176719, rs2066865 y rs2036914 + SEQ ID N.º: 2	0,631
rs6025, rs1799963, rs8176719, rs2066865 y rs2036914 + SEQ ID N.º: 1 + SEQ ID N.º: 2	0,641

Ejemplo 2: Determinación del riesgo para mujeres que toman anticonceptivos hormonales

Se ha determinado la presencia de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en un grupo de pacientes que incluye mujeres que toman anticonceptivos hormonales (tabla 9). Para cada paciente, el genotipo de SEQ ID N.º: 1, de SEQ ID N.º: 2 y los antecedentes familiares se han indicado mediante valores tal como sigue:

El valor de SEQ ID N.º: 1-2 es 2 = homocigoto para el alelo con efecto, 1 = heterocigoto para el alelo con efecto, 0 = homocigoto para el alelo sin efecto.

Antecedentes familiares: 0 = sin antecedentes familiares de enfermedad de la coagulación sanguínea, 1 = antecedentes familiares (primer grado) de enfermedad de la coagulación sanguínea.

Se indica el desarrollo de una trombosis venosa profunda (DVT) o una embolia pulmonar (PE) para cada paciente.

Tabla 9:

N.º de paciente	SEQ ID N.º: 1	SEQ ID N.º: 2	Antecedentes familiares	Desarrollo de DVT/PE
1	0	0	0	ninguno
2	0	0	1	ninguno
3	0	0	0	ninguno
4	0	0	0	ninguno
5	0	0	0	ninguno
6	0	0	1	ninguno
7	0	0	0	ninguno
8	0	0	0	ninguno
9	0	0	0	ninguno
10	0	0	1	ninguno
11	1	0	1	PE
12	1	0	0	DVT
13	1	0	0	DVT
14	2	0	0	DVT
15	0	1	0	DVT
16	0	1	1	DVT
17	0	2	0	DVT
18	1	1	0	DVT
19	1	1	0	DVT
20	1	1	0	DVT
21	1	1	0	DVT
22	1	1	1	DVT
23	1	1	0	PE
24	1	1	1	DVT

La presencia de SEQ ID N.º: 1 en las pacientes n.º 11-14 está asociada con la aparición de enfermedades de la coagulación sanguínea tales como DVT y PE. De manera similar, la presencia de SEQ ID N.º: 2 en las pacientes n.º 15-17 está asociada con la aparición de enfermedades de la coagulación sanguínea tales como DVT y PE. La presencia de tanto SEQ ID N.º: 1 como 2 en las pacientes 18-24 está asociada con DVT y PE. En cambio, las pacientes n.º 1 a 10 que son homocigotas para el alelo sin efecto de SEQ ID N.º: 1 y SEQ ID N.º: 2 no han desarrollado una enfermedad de la coagulación sanguínea.

Ejemplo 3: Determinación del riesgo para hombres

Características de la población estudiada

Entre 36 hombres, 19 han desarrollado un acontecimiento trombótico, o bien una trombosis venosa profunda (DVT) o bien una embolia pulmonar (PE). Se presenta la distribución de edad, el IMC y el tabaquismo en ambas poblaciones (tabla 10). La distribución de edad, el IMC y el tabaquismo son similares en ambos grupos.

Tabla 10:

Características clínicas (media)	Sujetos (n=17)	Controles (n= 19)
Edad (años)	44,5	47,5
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27	25
Tabaquismo	6	4

Se ha determinado la presencia de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en un grupo de pacientes que incluye hombres (tabla 11).

Para cada paciente, el genotipo de SEQ ID N.º: 1 y SEQ ID N.º: 2 se ha indicado mediante valores tal como sigue:

El valor de SEQ ID N.º: 1-2 es 2 = homocigoto para el alelo con efecto, 1 = heterocigoto para el alelo con efecto, 0 = homocigoto para el alelo sin efecto.

Se indica el desarrollo de una trombosis venosa profunda (DVT) o una embolia pulmonar (PE) para cada paciente.

Tabla 11:

N.º de paciente	SEQ ID N.º: 1	SEQ ID N.º: 2	Desarrollo de DVT/PE
25	0	0	ninguno
26	0	0	ninguno
27	0	0	ninguno
28	0	0	ninguno
29	0	0	ninguno
30	0	0	ninguno
31	1	0	PE
32	2	0	DVT
33	1	1	DVT
34	1	1	DVT
35	1	1	DVT
36	1	1	DVT

La presencia de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en los pacientes n.º 31-36 está asociada con la aparición de enfermedades de la coagulación sanguínea tales como DVT y PE en hombres. En cambio, los pacientes n.º 25-30 no han desarrollado una enfermedad de la coagulación sanguínea

Ejemplo 4: Determinación del riesgo incluyendo una combinación de SNP

Se ha determinado la presencia de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en un grupo de pacientes junto con un alelo en forma heterocigota u homocigota en al menos un SNP seleccionado del grupo que comprende el alelo A en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), el alelo A en rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), el alelo G en rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), el alelo (-) en rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), el alelo G en rs9574 (SEQ ID N.º: 7), el alelo T en rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y el alelo G en rs710446 (SEQ ID N.º: 9) (tabla 12).

Para cada paciente, el genotipo de SEQ ID N.º: 1 y SEQ ID N.º: 2 se ha indicado mediante valores tal como sigue:

El valor de SEQ ID N.º: 1-9 es 2 = homocigoto para el alelo con efecto, 1 = heterocigoto para el alelo con efecto, 0 = homocigoto para el alelo sin efecto.

Se indica el desarrollo de una trombosis venosa profunda (DVT) o una embolia pulmonar (PE) para cada paciente.

El sexo de cada paciente se indica como M para hombres y F para mujeres.

Tabla 12:

	SEQ ID N.º:										
N.º de paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	DVT/PE	Sexo
37	0	0	1	0	1	0	1	0	1	ninguno	F
38	0	0	0	1	1	1	1	0	0	ninguno	F
39	0	0	0	1	1	0	1	1	0	ninguno	F
40	0	0	0	0	0	0	1	2	2	ninguno	M
41	0	0	0	0	1	0	0	0	0	ninguno	M
42	0	0	0	0	1	0	1	0	0	ninguno	M
43	0	0	0	0	1	0	1	0	1	ninguno	M
44	1	0	0	0	2	0	1	2	0	DVT	M
45	2	0	0	0	2	0	1	1	2	PE	M
46	1	0	0	1	1	0	1	2	2	PE	F
47	1	0	1	0	1	0	0	1	2	DVT	F
48	1	1	0	1	1	0	1	1	0	DVT	M
49	1	1	0	0	1	0	1	0	0	DVT	M
50	1	1	1	0	1	0	1	2	2	DVT	F
51	1	1	1	0	1	0	0	0	2	DVT	F

Ejemplo 5: Determinación del riesgo incluyendo rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 con parámetros clínicos

Se ha determinado la presencia de rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y/o rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en un grupo de pacientes junto con parámetros clínicos (tabla 13).

- 10 Para cada paciente, los antecedentes familiares, el IMC, la edad, el tabaquismo y el genotipo de SEQ ID N.º: 1-2 se han indicado mediante valores tal como sigue:
El valor de SEQ ID N.º: 1-2 es 2 = homocigoto para el alelo con efecto, 1 = heterocigoto para el alelo con efecto, 0 = homocigoto para el alelo sin efecto.

- 15 Los antecedentes familiares son 0 = sin antecedentes familiares de enfermedad de la coagulación sanguínea, 1 = antecedentes familiares (primer grado) de enfermedad de la coagulación sanguínea.

El tabaquismo es 0 = no fumador; 1 = fumador actual.

- 20 Se indica el desarrollo de una trombosis venosa profunda (DVT) o una embolia pulmonar (PE) para cada paciente así como el sexo, M para hombres y F para mujeres.

Tabla 13:

N.º de paciente	SEQ ID N.º: 1	SEQ ID N.º: 2	Antecedentes familiares	IMC	Edad	Tabaquismo	Desarrollo de DVT/PE	Sexo
52	0	0	0	30,1	46	0	ninguno	M
53	0	0	0	40	36	1	ninguno	M
54	0	0	0	21,1	24	0	ninguno	M
55	0	0	0	21,8	19	1	ninguno	F
56	0	0	0	23	42	0	ninguno	F
57	0	0	0	22,5	42	0	ninguno	F
58	2	0	0	21	41	0	DVT	M
59	1	0	0	27,7	75	0	PE	M
60	2	0	0	20,8	29	0	DVT	F
61	0	1	0	29	22	1	PE	F
62	1	1	1	24	54	0	DVT	M
63	1	1	0	18,9	19	1	DVT	F

Ejemplo 6: Determinación del riesgo incluyendo una combinación de 9 SNP con parámetros clínicos

Se han determinado el genotipo de SEQ ID N.º: 1 a SEQ ID N.º: 9 y diversos parámetros clínicos en un grupo de pacientes que incluye mujeres que toman anticonceptivos hormonales (tabla 14). Para cada paciente, los antecedentes familiares, el IMC, la edad, el tabaquismo y el genotipo de SEQ ID N.º: 1 a SEQ ID N.º: 9 se han indicado mediante valores tal como sigue:

Antecedentes familiares: 0 = sin antecedentes familiares de enfermedad de la coagulación sanguínea, 1 = antecedentes familiares (primer grado) de enfermedad de la coagulación sanguínea.

Tabaquismo: 0 corresponde a un sujeto no fumador y 1 corresponde a un sujeto fumador.

El valor de SEQ ID N.º: 1 a SEQ ID N.º: 9 es 2 = homocigoto para el alelo con efecto, 1 = heterocigoto para el alelo con efecto, 0 = homocigoto para el alelo sin efecto.

Se indica el desarrollo de una trombosis venosa profunda (DVT) o una embolia pulmonar (PE) para cada paciente.

Tabla 14:

Paciente	SEQ ID N.º:									Parámetros clínicos				Desarrollo de:
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Antecedentes familiares	IMC	Edad	Tabaquismo	
64	1	0	0	1	1	0	1	2	2	1	22,79	34	1	PE
65	1	0	1	0	1	0	0	1	2	0	27,92	48	0	DVT
66	1	0	0	1	2	0	0	1	2	0	20,31	38	0	DVT
67	2	0	1	0	1	0	1	1	1	0	20,83	29	0	DVT
68	2	0	0	1	1	0	2	2	1	0	24,14	19	0	DVT
69	0	1	1	0	2	0	1	1	1	0	23,05	24	1	DVT
70	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	28,93	22	1	PE
71	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	18,87	19	1	DVT
72	1	1	1	0	1	0	1	2	2	0	20,45	15	0	DVT
73	1	1	1	0	1	0	0	0	2	0	20,42	21	1	DVT
74	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	20,76	16	0	PE
75	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	21,8	19	1	ninguno
76	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	22,955	42	0	ninguno
77	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	22,463	42	0	ninguno
78	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	16,9	29	1	ninguno
79	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	18,37	27	1	ninguno
80	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	19,53	20	0	ninguno
81	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	20,4	23	1	ninguno

En el contexto de la invención, un informe indicará si el sujeto es heterocigoto u homocigoto para el alelo con efecto, u homocigoto para el alelo sin efecto. El informe incluirá una puntuación de probabilidad de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.

Para calcular la puntuación, el factor de riesgo determinado para un polimorfismo de un solo nucleótido de la invención puede ponderarse por un coeficiente dependiendo de cuál sea la contribución de dicho polimorfismo de un solo nucleótido en la determinación del riesgo, en comparación con el otro polimorfismo de un solo nucleótido. Normalmente, el método para calcular la puntuación se basa en estudios estadísticos realizados sobre diversas cohortes de pacientes. La puntuación también puede incluir otros diversos parámetros del paciente (tales como parámetros clínicos). El peso dado a cada parámetro se basa en su contribución relativa a los otros parámetros para explicar la variabilidad entre individuos de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.

Esta probabilidad se deriva de un modelo que incluye el factor de riesgo determinado para el rs6025 (SEQ ID N.º: 3); rs1799963 (SEQ ID N.º: 4); rs8176719 (SEQ ID N.º: 5); rs8176750 (SEQ ID N.º: 6); rs9574 (SEQ ID N.º: 7); rs2289252 (SEQ ID N.º: 8); rs710446 (SEQ ID N.º: 9); rs4379368 (SEQ ID N.º: 2); y/o rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) o cualquier SNP en desequilibrio de ligamiento con los SNP citados anteriormente.

La puntuación de probabilidad también puede incluir parámetros clínicos (por ejemplo tabaquismo, el IMC, la edad, los antecedentes familiares de enfermedades de la coagulación sanguínea y/o el cambio en los niveles hormonales) y el tipo de hormona usada por el sujeto. La puntuación de probabilidad también puede generarse a partir de un programa informático para establecer tal puntuación.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Gene Predictis SA

<120> MÉTODO PARA PREDECIR EL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y EMBOLIA PULMONAR

<130> 51144/WO

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 51
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 10 <223> "n" es C o T

<400> 1
 gatggggaag aggagcattg aggacngtgt tcaagaggaa gcccgtgcc t 51

15 <210> 2
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> "n" es C o T

<400> 2
 25 tggatggtat tgacttttac atcacngaag gtgtttccat agatggaaga c 51

<210> 3
 <211> 51
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> "n" es A o G
 35

<400> 3
 tgtaagagca gatccctgga caggcnagga atacaggtat ttgtccttg a 51

<210> 4
 40 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> "n" es A o G
 45

<400> 4
 50 gttcccaata aaagtgactc tcagynagcc tcaatgctcc cagtgcatt c 51

<210> 5
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <223> "n" es - o G

<400> 5
 60 gcagtaggaa ggaatgtctc gtggnaccc ctggctggc tccattgtc t 51

<210> 6
 <211> 51
 65 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> "n" es - o C
 5
 <400> 6
 ccaagaacca ccaggcggtc cggaanccgt gagcggctgc caggggctct g 51
 <210> 7
 10 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <223> "n" es C o G
 <400> 7
 gcgatgttaa ttactctcca gcccctcag aaggggctgg attgatggag g 51
 20 <210> 8
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> "n" es C o T
 30 <400> 8
 gtgagggtga ggctgtctc tctctngccc tctcatcctg gcacatgtgc g 51
 <210> 9
 <211> 51
 35 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <223> "n" es A o G
 <400> 9
 agggatccaa tcgtcatcac tctgtntggg agctggtgat ataggaggca t 51

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea, comprendiendo el método determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido que consisten en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).
2. Método según la reivindicación 1, en el que la presencia del alelo T en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y del alelo T en rs4379368 (SEQ ID N.º: 2) en forma heterocigota u homocigota indica que dicho sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho método comprende además determinar el genotipo de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho método comprende además determinar el genotipo de un polimorfismo de un solo nucleótido seleccionado del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es una mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha mujer que experimenta un cambio en los niveles hormonales está tomando un anticonceptivo, un anticonceptivo combinado, una terapia de reemplazo hormonal, un anticonceptivo de progestágeno solo, está embarazada, está recibiendo tecnología de reproducción asistida o está en periodo posparto.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar los factores de riesgo clínico de dicho sujeto, seleccionándose dichos factores de riesgo clínico del grupo que comprende el tabaquismo, el IMC, la edad, los antecedentes familiares de enfermedades de la coagulación sanguínea y el cambio en los niveles hormonales.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas enfermedades de la coagulación sanguínea se seleccionan del grupo que comprende trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, trombosis venosa y trombosis arterial.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido se determina mediante secuenciación de ácidos nucleicos y/o mediante análisis de PCR.
10. Kit dirigido al método para identificar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad de la coagulación sanguínea según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, consistiendo dicho kit en:
 - i) sondas específicas para detectar polimorfismos de un solo nucleótido que consisten en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2); y opcionalmente sondas específicas para detectar polimorfismos de un solo nucleótido seleccionados del grupo que consiste en rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9); y opcionalmente
 - ii) instrucciones para su uso.
11. Kit según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho kit consiste en sondas específicas para detectar polimorfismos de un solo nucleótido seleccionados del grupo que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1), rs4379368 (SEQ ID N.º: 2), rs6025 (SEQ ID N.º: 3), rs1799963 (SEQ ID N.º: 4), rs8176719 (SEQ ID N.º: 5), rs8176750 (SEQ ID N.º: 6), rs9574 (SEQ ID N.º: 7), rs2289252 (SEQ ID N.º: 8) y rs710446 (SEQ ID N.º: 9).
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un programa informático o un medio legible por ordenador que contiene medios para determinar, en una muestra de dicho sujeto, el genotipo de un polimorfismo de un solo nucleótido que consiste en rs1799853 (SEQ ID N.º: 1) y rs4379368 (SEQ ID N.º: 2).