

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

INVENTARIO

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. **11-28662**

54. TÍTULO METODO DE IDENTIFICACION DE FACTORES DE RIESGO DE LA
ENFERMEDAD

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, ICN.

DOMICILIO DURHAM, NORTH CAROLINA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

Recibido
12-03-2011

Recibido
28-03-2011

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-028662- -00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYI

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 214

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE

(71)

Nombre: ZINFANDEL

PHARMACEUTICALS, INC.

Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Carolina del Norte, estados Unidos de América

Dirección: One Science Drive, Durham, North Carolina 27708, Estados Unidos de América

Domicilio: Durham, North Carolina, Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)

(72)

1. Allen D. ROSES

53525 Bickett, Chapel Hill, North Carolina 27517, Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/053373

Fecha: 11 de agosto de 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/019550 A4

Fecha: 18 de febrero de 2010

6

Título (54)

MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD

7

Clasificación Internacional (51)

G01N 033/048

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US
US

(32) Fecha

12 de agosto de 2008
12 de junio de 2009
10 de julio de 2009

(31) Número de Solicitud

61/088,203
61/186,673
61/224,647

9	Comprobante de pago No.: <u>11-0018709</u>	Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u>
	Comprobante de pago No.: <u>11-0015700</u>	Fecha: <u>21 de febrero de 2011</u>
	Comprobante de pago No.: <u>11-0015701</u>	Fecha: <u>21 de febrero de 2011</u>
	Comprobante de pago No.: <u>11-0018695</u>	Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u>
	Comprobante de pago No.: <u>11-0018730</u>	Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u>
	Comprobante de pago No.: <u>11-0018731</u>	Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u>

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.oo.

☒

Comprobante de pago por 86 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$2.322.000.oo.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☐

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☒

Arte final 12x12

☐

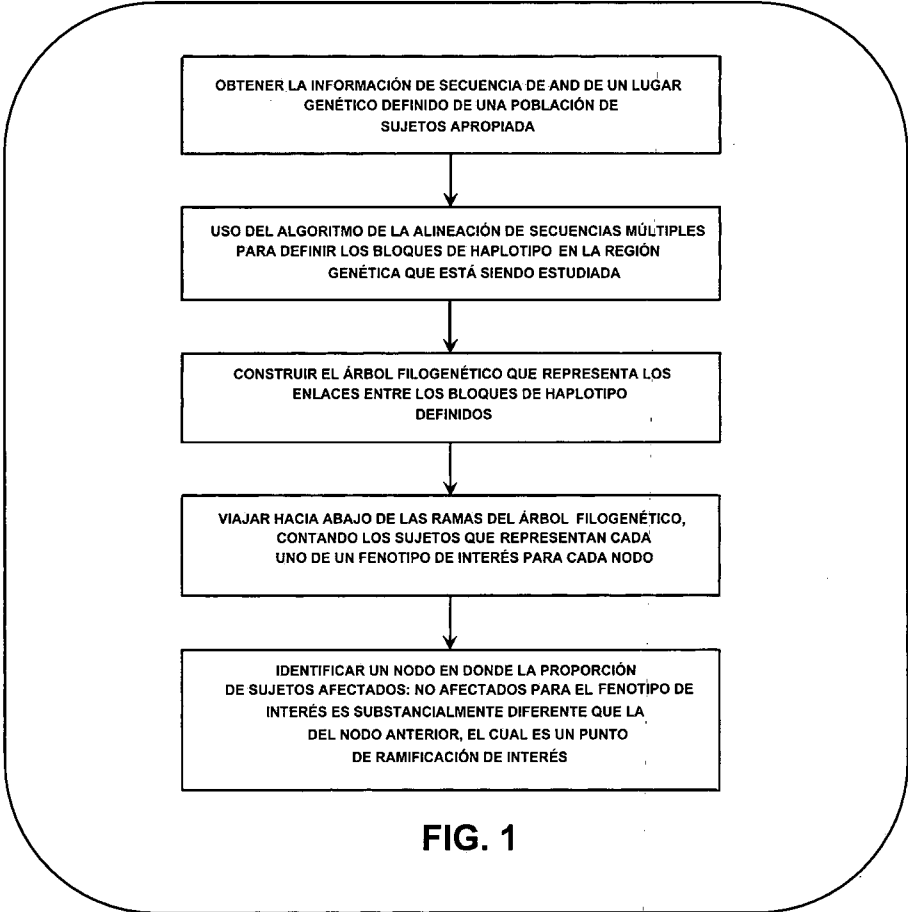
De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/019550 A1

Descripción:

Páginas 124 en español

Reivindicaciones: Número (s) 96

Figuras: Número (s) 9

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Solicitud de cambio de nombre del solicitante **SHIRAZ PHARMACEUTICALS, INC.** por **ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC.**, presentada durante la fase nacional.

5. ☒ Modificaciones del Artículo 19 del PCT

6. ☒ Extracto de publicación.

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 February 2010 (18.02.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/019550 A4

- (51) International Patent Classification:
G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2009/053373
- (22) International Filing Date:
11 August 2009 (11.08.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/088,203 12 August 2008 (12.08.2008) US
61/186,673 12 June 2009 (12.06.2009) US
61/224,647 10 July 2009 (10.07.2009) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **SHIRAZ PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; One Science Drive, Durham, North Carolina 27708 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): **ROSES, Allen D.** [US/US]; 53525 Bickett, Chapel Hill, North Carolina 27517 (US).
- (74) Agent: **MYERS BIGEL SIBLEY & SAJOVEC, P.A.**; P.O. Box 37428, Raleigh, North Carolina 27627 (US).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with amended claims (Art. 19(1))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING DISEASE RISK FACTORS

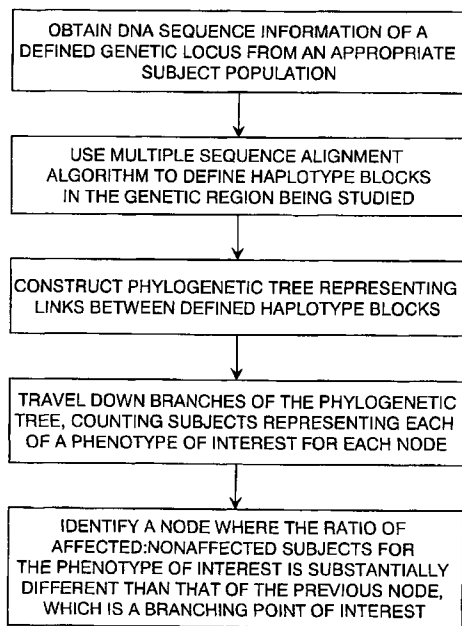


FIG. 1

(57) Abstract: Provided herein is a method for identifying a genetic variant that is associated with development of a condition of interest (e.g., Alzheimer's disease), and genetic variants so identified. Methods of treatment with an active agent (e.g., with a particular active agent and/or at an earlier age) is also provided, upon detecting a genetic variant described herein. In some embodiments, the genetic variant is a deletion/insertion polymorphism (DIP) of the TOMM40 gene. Kits for determining if a subject is at increased risk of developing late onset Alzheimer's disease is also provided. Kits for determining if a subject is responsive to treatment for a condition of interest with an active agent are further provided.

WO 2010/019550 A4



(88) Date of publication of the international search report: 22 April 2010 Date of publication of the amended claims: 13 January 2011

7

MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD

Solicitudes Relacionadas

5 La presente solicitud reclama la prioridad sobre la
Solicitud Provisional de Patente Norteamericana No.
61/088,203, presentada en Agosto 12, 2008; la Solicitud
Provisional de Patente Norteamericana No. 61/186,673,
presentada en Junio 12, 2009; y la Solicitud Provisional de
10 Patente Norteamericana No. 61/224,647, presentada en Julio
10, 2009, cuyas descripciones están incorporadas en su
totalidad a la presente solicitud como referencia.

Campo de la Invención

15 La presente invención se refiere al campo de la genómica,
genética, farmacogenética, y bioinformática, que incluye el
análisis del genoma en el estudio de la variación de secuencias
de ADN. La presente invención también se refiere a estudios de
asociación entre variaciones en las secuencias de ADN y la
anticipación de una susceptibilidad individual a una
20 enfermedad, desorden, o padecimiento particular y/o la
respuesta a un fármaco o tratamiento particular.

Antecedentes de la Invención

25 La búsqueda de marcadores genéticos asociada con
enfermedades complejas en progreso. Los estudios de
exploración a nivel del genoma con adaptaciones SNP

continúan destacando una región ApoE como el área más importante para la investigación en el estudio de la enfermedad de Alzheimer (Coon y asociados, J. Clin. Psychiatry 68: páginas 613 a 618 (2007); Li y asociados, Arch. Neurol. 65: páginas 45 a 53 (2007)).

La isoforma ApoE 4 había sido anteriormente asociada de manera fuerte con el riesgo creciente de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en una presentación tardía. (Pericak-Vance y asociados, Am. J. Hum. Genet. 48, páginas 1034 a 1050 (1991); Martin y asociados, 2000, Patente Norteamericana No. 6,027,896 otorgada a Roses, y asociados, Patente Norteamericana No. 5,716,828 otorgada a Roses y asociados). La relación es dependiente de la dosis (Yoshizawa y asociados, 1994; Schellenberg, 1995). Es decir, un portador de dos alelos ApoE 4 es más probablemente que desarrolle una enfermedad de Alzheimer de presentación tardía (LOAD) que un portador de solamente un alelo (LOAD) ApoE 4, y en una etapa temprana (Corder y asociados, Science 261, páginas 921 a 923 (1993)).

No obstante, los alelos E4 son responsables de nada más el 50% de la enfermedad hereditaria de Alzheimer. Una explicación es que el alelo ApoE 4 únicamente sirve como un marcador subrogado para algo en el enlace del desequilibrio cercano. Alternativamente, tomando en consideración el descubrimiento reciente de un rol mecánico para el alelo ApoE

4 en la toxicidad de la mitocondria, los efectos negativos del alelo ApoE 4 pueden ser abrogados o exacerbados por otros productos del gen codificados de manera cercana (Chang y asociados, 2005).

5 Como la condición del ApoE también está asociada con el riesgo de la enfermedad de la arteria coronaria y probablemente también es un huésped de otras enfermedades y padecimientos, las implicaciones del estudio de la región ApoE no están limitadas a la enfermedad de Alzheimer, sino que están
10 alcanzando potencialmente más lejos (Mahley y asociados, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 103: páginas 5644 a 5651 (2006)). Más ampliamente, el examen de las secuencias variantes para los procesos o trayectorias que rodean los genes en el desequilibrio de enlace con otras regiones genéticas que se
15 conoce que están involucradas en procesos de enfermedad complejas proporcionarán información valiosa para descifrar los mecanismos de dichas enfermedades.

Breve Descripción de la Invención

 Aquí se proporciona un método para identificar una
20 variante genética que está asociada con el desarrollo de un padecimiento de interés (por ejemplo, la presentación tardía o temprana de una enfermedad de interés), que comprende: (a) la determinación de las muestras biológicas que contienen el ADN de las secuencias de nucleótidos llevadas para una pluralidad
25 de sujetos humanos individuales en un lugar genético de

interés, en donde los sujetos incluyen ambos (i) los sujetos afectados con el padecimiento de interés y (ii) los sujetos no afectados con el padecimiento de interés; (b) identificar la variante genética de dicho lugar genético de las secuencias de nucleótidos observadas en dicha pluralidad de sujetos (por ejemplo, utilizando un análisis de alineación de secuencia múltiple); (c) mapear las variantes genéticas construyendo un árbol filogenético de dichas secuencias de nucleótidos de dichos sujetos, comprendiendo dicho árbol ramas que identifican cambios de variantes entre dichos sujetos (por ejemplo, cambios de variantes en el mismo cistron); (d) examinar las variantes genéticas representadas como ramas en dicho árbol y determinar la proporción de sujetos afectados y no afectados para identificar los cambios que conducen a una proporción cambiada de sujetos afectados o no afectados (preferentemente en donde el punto de partida es la variante genética que representa el número mayor de sujetos); y luego (e) identificar una variante o grupo de variantes genéticas (un haplotipo) en donde la proporción de sujetos afectados a no afectados es substancialmente diferente a una o más variantes adyacentes de dicho árbol (por ejemplo, por lo menos en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90% diferentes) para identificar de este modo una variante genética asociada con el desarrollo de dicho padecimiento de interés.

En algunas modalidades, todos los sujetos son portadores de un mismo polimorfismo conocido que está asociado con el padecimiento de interés.

En algunas modalidades, el padecimiento de interés es
5 una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad metabólica (por ejemplo, dislipidemia), una enfermedad cardiovascular, un padecimiento psiquiátrico, o cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad de interés es una enfermedad en la cual el ApoE y/o TOMM40 están implicados en la patogénesis de la
10 enfermedad.

En algunas modalidades, el padecimiento de interés está asociado con la disfunción aumentada o disminuida de la mitocondria. En algunas modalidades, el padecimiento de interés es esquizofrenia. En algunas modalidades, el
15 padecimiento de interés es una enfermedad de la arteria coronaria. En algunas modalidades, el padecimiento de interés es la diabetes melitus tipo II. En algunas modalidades, el padecimiento de interés es la enfermedad de Parkinson. En algunas modalidades, el padecimiento de interés es la
20 enfermedad de Alzheimer.

En algunas modalidades, el factor de riesgo del polimorfismo conocido es el alelo de Apolipoproteína E (por ejemplo, ApoE 2, ApoE 3 o ApoE 4).

En algunas modalidades, el lugar genético de interés es
25 un desequilibrio de enlace con el polimorfismo conocido. En

algunas modalidades, el lugar genético de interés es en el mismo cromosoma y menos de 10, 20, 30, 40, ó 50 kilobases lejos del polimorfismo conocido. En algunas modalidades, el lugar genético es el gen TOMM40.

5 También se proporciona un método para determinar el riesgo aumentado del desarrollo de un padecimiento de interés, el cual comprende: (a) determinar de una muestra biológica que contiene el ADN una variante genética identificada por el método de cualquiera de los párrafos precedentes portado por
10 un sujeto individual; y luego (b) determinar que el sujeto se encuentra en un riesgo aumentado para el desarrollo del padecimiento de interés cuando está presente la variante genética.

 Además se proporciona un método para determinar el
15 riesgo aumentado para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto (por ejemplo, un sujeto portador de por lo menos un alelo Apo E3), que comprende: (a) determinar de una muestra biológica que contiene el ADN tomado del sujeto en la presencia o ausencia de la variante genética del gen
20 TOMM40 asociado con el riesgo aumentado o disminuido de la enfermedad de Alzheimer; y (b) determinar que el sujeto se encuentra en un riesgo aumentado o disminuido de la enfermedad de Alzheimer cuando la variante genética está presente o ausente.

25 En algunas modalidades, se determina si el sujeto es un

sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4. En algunas modalidades, se determina si el sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

En algunas modalidades, el método incluye además el
5 paso de: (c) administrar un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer al sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento cuando el sujeto es determinado que se encuentra en riesgo de la enfermedad de Alzheimer.

En algunas modalidades, el paso de administración se
10 lleva a cabo en el sujeto en una edad temprana cuando el sujeto es determinado que se encuentra en un riesgo aumentado por la presencia o ausencia de la variante genética comparado con un sujeto en el cual la variante genética no está presente o ausente (por ejemplo, para un sujeto ApoE 4/4, comenzando a la edad de 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, ó 53
15 años, y continuamente a través de cada año posterior, en vez de comenzar a la edad de 55 años o mayor; para un sujeto ApoE 4/3, a la edad de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, ó 58 años, y continuamente a través de cada año posterior, en vez
20 de comenzar a la edad de 60 años o mayor; para un sujeto ApoE 3/3, a la edad de 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, ó 63 años, y continuamente a través de cada año posterior, en vez de comenzar a la edad de 65 años o mayor; y para un sujeto ApoE 2/3, a la edad de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, ó 68
25 años, y continuamente a través de cada año posterior, en vez

de comenzar a la edad de 70 años o mayor).

En algunas modalidades, el agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores
 5 de PPAR (por ejemplo, fármacos de las clases de tiazolidindiona o glitazar), anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de las mismas. En algunas modalidades, el agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la
 10 misma.

En algunas modalidades, la variante genética del gen TOMM40 es una variante que se encuentra en la lista de la Tabla 1 que se presenta más adelante.

Se proporciona también un método de tratamiento de un
 15 sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene por lo menos un alelo ApoE 3) para la enfermedad de Alzheimer administrando un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer al sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento; comprendiendo la mejora: la administración del agente activo al sujeto en una edad
 20 temprana cuando el sujeto es portador de una variante genética del gen TOMM40 asociada con el riesgo aumentado de la enfermedad de Alzheimer comparado con un sujeto correspondiente quien no es el portador de la variante genética (por ejemplo, para un sujeto ApoE 4/4, comenzando a la edad
 25 de 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, ó 53 años, y continuamente a

través de cada año posterior, en vez de comenzar a la edad de 55 años o mayor; para un sujeto ApoE 4/3, a la edad de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, ó 58 años, y continuamente a través de cada año posterior, en vez de comenzar a la edad de 60 años o mayor; para un sujeto ApoE 3/3, a la edad de 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, ó 63 años, y continuamente a través de cada año posterior, en vez de comenzar a la edad de 65 años o mayor; y para un sujeto ApoE 2/3, a la edad de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, ó 68 años, y continuamente a través de cada año posterior, en vez de comenzar a la edad de 70 años o mayor).

En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

En algunas modalidades, el agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores de PPAR (por ejemplo, fármacos de las clases de tiazolidindiona o glitazar), anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de las mismas. En algunas modalidades, el agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En algunas modalidades, la variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP). En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción.

En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción poli-T (por ejemplo, un poli-T de entre 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

En algunas modalidades, la variante genética del gen TOMM40 es una variante que se encuentra en la Tabla 1 que se presenta más adelante. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523.

Además se proporciona un método de tratamiento para un padecimiento de interés, en donde el padecimiento de interés está asociado con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40, para un paciente que lo necesita, incluyendo el método los pasos de: (a) determinar la presencia o ausencia de una variante genética identificada por el método del párrafo 1-12 portada por un sujeto individual para generar un perfil genético del paciente; y luego, si el perfil indica que el paciente actúa en respuesta a un agente activo, (b) administrar el agente activo al sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento para tratar el padecimiento de interés.

En algunas modalidades, el agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores de PPAR (por ejemplo, fármacos de las clases de tiazolidindiona o glitazar), anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de las

mismas. En algunas modalidades, el agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En algunas modalidades, la variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP). En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción. En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción poli-T (por ejemplo, una inserción de poli-T de entre 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

En algunas modalidades, la variante genética del gen TOMM40 es una variante del gen TOMM40 de la lista de la Tabla 1 que se presenta más adelante. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523.

También se proporciona un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, incluyendo: (a) detectar de una muestra biológica que contiene el ADN tomado del sujeto en la presencia o ausencia de una variante genética del gen TOMM40 asociada con la capacidad de respuesta a un agente activo; y, si la variante genética está presente, (b) administrar el agente activo al sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento para tratar la enfermedad de Alzheimer.

En algunas modalidades, el sujeto es portador de por lo menos un alelo ApoE 3. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

En algunas modalidades, el agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores de PPAR (por ejemplo, fármacos de las clases de tiazolidindiona o glitazar), anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de las mismas. En algunas modalidades, el agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En algunas modalidades, la variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP). En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción. En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción poli-T (por ejemplo, un poli-T de entre 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

En algunas modalidades, la variante genética del gen TOMM40 es una variante de la lista de la Tabla 1 que se presenta más adelante. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523.

Se proporciona además el uso de un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer para la preparación de un medicamento para llevar a cabo un método de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con los párrafos establecidos anteriormente. También se proporciona el uso de

un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer para llevar a cabo un método de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer.

Se proporciona un método para determinar un pronóstico
5 para un paciente en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, incluyendo la obtención de un perfil del paciente, en donde la obtención del perfil del paciente incluye: detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE en una muestra biológica del paciente, y detectar la presencia o
10 ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción del gen TOMM40 (DIP) localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y luego, convertir el perfil del paciente en el pronóstico, en donde la presencia del alelo ApoE y la presencia de por lo menos un polimorfismo DIP
15 del gen TOMM40 identifica al paciente como un paciente con riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción. En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción poli-T (por ejemplo, un poli-T de entre
20 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523.

En algunas modalidades, el método incluye además
25 detectar si el sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4,

E3/E3, E3/E4, E4/E4. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

También se proporciona un método para estratificar a un sujeto dentro de un subgrupo de un ensayo clínico de una
5 terapia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el método: detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE en una muestra biológica del paciente, y detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción del gen TOMM40 (DIP)
10 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, en donde el sujeto es estratificado en un subgrupo para el ensayo clínico de la terapia basada en la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE y/o DIP del gen TOMM40.

En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de
15 inserción. En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción poli-T (por ejemplo, una inserción de poli-T de entre 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es
20 rs10524523.

En algunas modalidades, el método incluye además detectar si el sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

25 Se proporciona adicionalmente un método para identificar

a un paciente en un ensayo clínico de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer incluyendo: a) identificar a un paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer; y b) determinar un pronóstico para el paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer que comprende obtener un perfil del paciente, en donde el perfil del paciente comprende i) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE en una muestra biológica del paciente, ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción del gen TOMM40 (DIP) localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y iii) convertir el perfil del paciente en el pronóstico, incluyendo el pronóstico una predicción con respecto a si el paciente es un candidato para el ensayo clínico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción. En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción poli-T (por ejemplo, un poli-T de entre 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523.

En algunas modalidades, el método incluye además detectar si el sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4. En algunas modalidades, el sujeto es un

sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

Se proporciona un equipo para determinar si un sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la presentación tardía de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo:

- 5 (A) por lo menos un reactivo que detecta específicamente los alelos ApoE 3, ApoE 4, o ApoE 2, en donde el reactivo es seleccionado del grupo consistente de anticuerpos que se enlazan selectivamente ApoE 3, ApoE 4, o ApoE 2, y muestras de oligonucleótidos que se enlazan selectivamente al ADN que
- 10 codifica las mismas; (B) por lo menos un reactivo que detecta específicamente la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción del gen TOMM40 (DIP) localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y (C) instrucciones para determinar que el sujeto se encuentra en un
- 15 riesgo aumentado de desarrollar la presentación tardía de la enfermedad de Alzheimer mediante: (i) detectar la presencia o ausencia de una isoforma ApoE en el sujeto con dicho al menos un reactivo; (ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción del gen
- 20 TOMM40 (DIP) localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y (iii) observar si el sujeto se encuentra o no en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía observando si la presencia de la isoforma ApoE y el DIP del gen TOMM40 es o no detectado con al menos
- 25 un reactivo, en donde la presencia de la isoforma ApoE y el DIP

del gen TOMM40 DIP indica que el sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía.

En algunas modalidades, dicho al menos un reactivo y las
5 instrucciones son empacadas en un solo contenedor.

En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción. En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción poli-T (por ejemplo, un poli-T de entre 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

10 En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es rs10524523.

En algunas modalidades, el paso de determinación incluye además detectar si el sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3,
15 E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

Se proporciona un equipo para determinar si un sujeto actúa en respuesta al tratamiento para un padecimiento de interés, en donde el padecimiento de interés está asociado con
20 el alelo ApoE y/o el gen TOMM40, con un agente activo, incluyendo el equipo: (A) por lo menos un reactivo que detecta específicamente el ApoE 3, ApoE 4, o ApoE 2, en donde el reactivo es seleccionado del grupo consistente de anticuerpos que se enlazan selectivamente al ApoE 3, ApoE 4, o ApoE 2, y
25 muestras de oligonucleótidos que se enlazan selectivamente al

ADN que codifica los mismos; (B) por lo menos un reactivo que detecta específicamente la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción del gen TOMM40 (DIP) localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y (C) instrucciones para determinar que el sujeto actúa en respuesta al tratamiento para el padecimiento de interés con el agente activo de interés mediante: (i) detectar la presencia o ausencia de la isoforma ApoE en el sujeto con dicho al menos un reactivo; (ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción del gen TOMM40 (DIP) localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y (iii) determinar si el sujeto actúa o no en respuesta al tratamiento observando si la presencia de la isoforma ApoE y el DIP del gen TOMM40 es o no detectada con dicho al menos un reactivo, en donde la presencia del alelo ApoE 3 y el DIP del gen TOMM40 indica que el sujeto actúa en respuesta al tratamiento con el agente activo.

En algunas modalidades, dicho al menos un reactivo y las instrucciones son empacadas en un solo contenedor.

En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de inserción. En algunas modalidades, el DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción poli-T (por ejemplo, un poli-T de entre 5 y 100, ó 10 y 80, ó 20 y 50 bp).

En algunas modalidades, el DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3. En algunas modalidades, el DIP es

rs10524523.

En algunas modalidades, el paso de determinación incluye además detectar si el sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4. En algunas modalidades, el
5 sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

Deberá quedar entendido que todas las modalidades anteriores pueden ser combinadas de cualquier modo y/o combinación. La siguiente son otros objetos y aspectos de la presente invención que se explican con mayor detalle en los
10 dibujos proporcionados en este documento y en la descripción establecida más adelante.

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra una gráfica de flujo general para identificar una variante genética en una región previamente
15 determinada de la secuencia genómica en un lugar genético de interés, el cual puede ser asociado con un padecimiento de interés, de acuerdo con algunas modalidades.

La figura 2 muestra una gráfica de la edad promedio de presentación de la enfermedad de Alzheimer como una función
20 de la herencia de los cinco genotipos comunes ApoE, y representa el alelo ApoE 4 como un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (1993).

La figura 3 muestra las Regiones A, B, y C en el Cromosoma 19, las cuales son lugares genéticos de interés de
25 ejemplo. El gen TOMM40 se encuentra en una proximidad

cercana al gen ApoE y codifica una proteína de 40 kD dirigida a la membrana exterior de la mitocondria. El gen TOMM40 actúa con el alelo ApoE directamente en la regulación de la importación de la proteína de la mitocondria, y una hipótesis
5 actual es que la presencia de una variante particular del gen TOMM40 exacerba el riesgo aumentado para la enfermedad de Alzheimer asociada con la presencia dependiente de la dosis del alelo ApoE 3.

La figura 4 muestra en una forma esquemática, un mapa
10 de evolución de la Región B como lo indica la figura 3 creado de acuerdo con algunas modalidades aquí detalladas. Cada óvalo horizontal representa una variante de la secuencia observada (por ejemplo, un cambio de nucleótidos), y el tamaño del óvalo representa su secuencia. Cada variante se denomina
15 un nodo en el árbol, y la conexión de un nodo con el otro nodo por una rama representa una observación de dos variantes en *cis* portadas por un sujeto individual.

La figura 5 es un diagrama esquemático del árbol filogenético basado en la Región B construida para el gen
20 TOMM40, que muestra los porcentajes de fenotipos ApoE en dos agrupaciones o grupos mayores, de las variantes del gen TOMM40 en esta región.

La figura 6 es una vista general esquemática del lugar del gen *TOMM40-alelo ApoE* incluyendo el trazo LD que muestra los
25 bloques y regiones del haplotipo para la elaboración de

secuencias primaria en los estudios exploratorios (R1) (23 Kb) y confirmatorios (R2) (10 Kb) (Construcción 36.3 del NCBI). El trazo LD se muestra para los datos Hapmap (pánel de análisis CEU), la definición del bloque sólido del haplotipo de la espina, valores r^2 con un esquema de color D'/LOD representado por

5 diferentes características de la línea.

La figura 7 muestra representaciones de los árboles filogenéticos con las variantes de separación. 7A: variantes de SNP, clases A contra B, del E6 al E10 representan los exones

10 del gen *TOMM40* y las líneas verticales indican las ubicaciones cercanas de los SNP. La separación de las dos ramas principales tiene el soporte fuerte de los tirantes (973/1000). 7B: polimorfismos de la longitud rs10524523. Se proporcionan estadísticas descriptivas de cada grupo de polimorfismos de

15 longitud. Varios haplotipos largos que formaron los grupos individuales en el árbol o grupos muy pequeños, se encuentran en el grupo identificado como "Restantes".

La figura 8 presenta histogramas de la longitud del polimorfismo de longitud rs10524523 estratificado por los

20 genotipos ApoE 3/3 (8A), 3/4 (8B), y 4/4 (8C), haplotipos N=210 (cohorte AS).

La figura 9 muestra la asociación entre la edad de presentación AD y la longitud del polimorfismo rs10524523 para los pacientes AD con presentación entre los 60 y 86 años. Los

25 trazos de los cuadros indican un rango del 95% (líneas

verticales), medio (línea horizontal en el cuadro) y un rango intercuartiles (cuadro).

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se explica con mayor detalle más
5 adelante. Esta descripción no pretende ser un catálogo
detallado de todos los modos diferentes en los cuales puede ser
implementada la presente invención, y todas las características
que puedan ser agregadas a la presente invención. Por ejemplo,
las características ilustradas con respecto a una modalidad
10 pueden ser incorporadas en otras modalidades, y las
características ilustradas con respecto a cualquier modalidad
particular pueden ser eliminadas de esa modalidad. Además, se
podrán apreciar numerosas variaciones y adiciones a las
diferentes modalidades sugeridas en este documento por los
15 expertos en la técnica a la luz de la descripción actual la cual
no se sale de la presente invención. De ahí que, la siguiente
descripción pretende ilustrar algunas modalidades particulares
de la invención, y no especificar exhaustivamente todos los
cambios, combinaciones y variaciones de la misma.

20 Como se usan en la presente descripción de la invención y
las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de “un”,
“una” y “el/la” pretenden incluir las formas plurales también
como, a menos que el contexto indique lo contrario. También,
como se usa en la presente descripción, “y/o” se refiere a y
25 comprende cualquiera y todas las combinaciones posibles de

una o más partidas de la lista, así como la carencia de combinaciones cuando son interpretadas en la alternativa ("o").

La presente invención se refiere a métodos para revelar la variación genética en regiones de interés particular para enfermedades o padecimientos complejos. También se refiere al descubrimiento de los marcadores genéticos más informativos en base de asociaciones con información del fenotipo. En una modalidad, la presente invención puede ser utilizada para localizar los marcadores genéticos asociados con la susceptibilidad a una enfermedad, desorden, o padecimiento particular. En otra modalidad, los datos con respecto a la respuesta del sujeto a un tratamiento candidato o fármaco pueden ser incluidos en un análisis filogenético para la localización de los marcadores genéticos asociados con una respuesta benéfica para el tratamiento o fármaco (por ejemplo, la farmacogenética). Los métodos pueden ser aplicados sobre cualquier conjunto de datos de variación genética de un lugar particular. Ver la figura 1 para la gráfica de flujo del método para encontrar los factores de riesgo genéticos de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto, el análisis de las variaciones genéticas está basado en los datos de secuencias variantes. En un segundo aspecto, la estructura no está cubierta utilizando datos del genotipo diploide, evitando de esta manera la necesidad de inferir ya sea experimentalmente o por medio de computadora

los haplotipos del componente (ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 6,027,896 otorgada a Roses y asociados). En otro aspecto, el método actual puede ser aplicado en una variación alélica no caracterizada que es el resultado de la
5 interrogación de un ácido nucleico objetivo con un procedimiento experimental que proporciona un registro de la variación de secuencia presente pero no proporciona realmente la secuencia completa. La estructura subyacente de la variación genética también es útil para la deducción de los haplotipos
10 constituyentes de los datos del genotipo diploide.

Se prefiere y está contemplado que los métodos aquí descritos sean utilizados en conjunto con otra información de diagnóstico clínico conocida o descrita en la técnica las cuales son utilizadas en la evaluación de los sujetos con enfermedades
15 o padecimientos (por ejemplo, aquellos que se consideran que comprenden disfunción de la mitocondria (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas)) o para la evaluación de los sujetos que se sospecha que están en riesgo de desarrollar dicha enfermedad.
20 La presente invención también se puede aplicar para el descubrimiento de los factores de riesgo genético para otras enfermedades, desórdenes y padecimientos complejos.

Las descripciones de todas las referencias de Patentes de los Estados Unidos de América aquí citadas por lo tanto están
25 incorporadas en su totalidad a la presente descripción como

referencia.

1. Definiciones. En la presente descripción se usan las siguientes definiciones:

“Padecimiento de interés” se refiere a un padecimiento, enfermedad, o desorden específico diseñado para el estudio filogenético y/o la diagnosis o pronóstico posterior. “Padecimiento” como se usa en la presente descripción, incluye pero no está limitado a, padecimientos asociados con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40 y/o la disfunción de la mitocondria, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades metabólicas, enfermedades psiquiátricas, y cáncer.

Los ejemplos de los padecimientos en los cuales han estado implicados el alelo ApoE y/o el gen TOMM40 incluyen, pero no están limitados a, enfermedades cardiovasculares; enfermedades metabólicas; enfermedades neurodegenerativas; traumas o enfermedades neurológicas; enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple (Pinholt M, y asociados, Apo E en esclerosis múltiple y neuritis óptica: el alelo apo E-epsilon4 está asociado con el progreso de la esclerosis múltiple. *Mult Scler.* **11**: páginas 511 a 515 (2005); Masterman, T. y Hillert, J. La exploración indicadora: APOE ε4 en la esclerosis múltiple. *Lancet Neurol.* **3**: página 331 (2004), lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico (Pullmann Jr. R, y asociados, Polimorfismo de la Apolipoproteína E en pacientes con SLE neuropsiquiátrico. *Clin Rheumatol.* **23**: páginas 97 a

101 (2004)), etc.)); infección viral (por ejemplo, enfermedad del hígado asociada con la infección por hepatitis C (Wozniak MA, y asociados, La apolipoproteína E-E4 protege contra una enfermedad severa del hígado ocasionada por el virus de la hepatitis C. *Hepatology*. **36**: páginas 456 a 463 (2004)), enfermedad de VIH (Burt TD, y asociados, La apolipoproteína (apo) E4 aumenta la entrada en las células del VIH-I *in vitro*, y el genotipo APOE epsilon4/epsilon4 acelera el progreso de la enfermedad por VIH. *Proc Natl Acad Sci EUA*. **105**: páginas 8718 a 8723 (2008)), etc.)); fracturas de cadera/osteoporosis (Pluijm SM, y asociados, Efectos del género y la edad en la asociación de la apolipoproteína E epsilon4 con la densidad mineral del hueso, rotación del hueso y el riesgo de fracturas en las personas más viejas. *Osteoporos Int*. **13**: páginas 701 a 709 (2002)); enfermedades de la mitocondria (Chang S, y asociados, Regiones de enlace del receptor y el lípido de los fragmentos de apolipoproteína E4 actúan en concierto para ocasionar la disfunción y neurotoxicidad de la mitocondria. *Proc Natl Acad Sci EUA*. **102**: páginas 18694 a 18699 (2005)); envejecimiento (Schächter F, y asociados, Asociaciones genéticas con longevidad humana en los lugares APOE y ACE. *Nat Genet*. **6**: páginas 29 a 32 (1994); Rea IM, y asociados, Alelos de apolipoproteína E en los sujetos nonagenarios en el Estudio de Longitudinal de Envejecimiento de Vida Libre de la Vejez de Belfast (BELFAST). *Mech. Aging and Develop*. **122**:

páginas 1367 a 1372 (2001)); inflamación (Li L, y asociados, La infección induce una respuesta positiva de la apolipoproteína E de fase aguda de un gen de fase aguda negativo: rol de los receptores hepáticos LDL. *J Lipid Res.* **49**: páginas 1782 a 1793
5 (2008)); y disfunción de la memoria (Caselli RJ, y asociados, Modelación longitudinal de la disminución de la memoria relacionada con la edad y el efecto de la APOE epsilon4. *N Engl J Med.* **361**: páginas 255 a 263 (2009)).

“Enfermedad cardiovascular” como se usa en la presente
10 descripción se refiere a una enfermedad que comprende el corazón y/o los vasos sanguíneos, incluyendo pero sin limitarse a, enfermedad de la arteria coronaria (Song Y, y asociados, Meta-análisis: genotipos de apolipoproteína E y riesgo de enfermedad coronaria del corazón. *Ann Intern Med.* **141**:
15 páginas 137 a 147 (2004); Bennet AM, y asociados, Asociación de los genotipos de apolipoproteína E con los niveles de lípidos y riesgo coronario. *JAMA* **298**: páginas 1300 a 1311 (2007)), aterosclerosis (Norata GD, y asociados, Efectos de las variantes PCSK9 en el espesor medio de la íntima de la arteria
20 carótida común y la relación con los alelos ApoE. *Atherosclerosis* (2009) Junio 27. [Publicación electrónica antes de la impresión], doi:10.1016/J.Atherosclerosis 2009.06.023; Paternoster L, y asociados, Asociación Entre el Genotipo de Apolipoproteína E y el Espesor Medio de la Íntima de la
25 Carótida Puede Sugerir un Efecto Específico en el Ataque

Aterotrombótico de la Arteria Grande. *Stroke* **39**: páginas 48 a 54 (2008)), enfermedad isquémica del corazón (Schmitz F, y asociados, La Asociación robusta de los alelos APOE 4 con el infarto al miocardio prematuro especialmente en pacientes sin
5 hipercolesterolemia: el estudio Aachen. *Eur. J. Clin. Investigation* **37**: páginas 106 a 108 (2007)), enfermedad vascular tal como el ataque isquémico (Peck G, y asociados, La genética del ataque hemorrágico primario, la hemorragia subaracnoide y los aneurismas intracraneales rotos en los
10 adultos. *PLoS One*. **3**: página e3691 (2008); Paternoster L, y asociados, La Asociación Entre el Genotipo de Apolipoproteína E y el Espesor Medio de la Íntima de la Carótida Puede Sugerir un Efecto Específico en el Ataque Aterotrombótico de la Arteria Grande. *Stroke* **39**: páginas 48 a 54 (2008)), demencia vascular
15 (Bang OY, y asociados, Un enlace importante entre un subtipo de demencia y la apolipoproteína E: un meta-análisis. *Yonsei Med J*. **44**: páginas 401 a 413 (2003); Baum L, y asociados, El alelo de apolipoproteína E epsilon4 está asociado con la demencia vascular. *Dement Geriatr Cogn Disord*. **22**: páginas
20 301 a 305 (2006)), etc.

“Enfermedad neurodegenerativa” como se usa en la presente descripción se refiere a la enfermedad de Alzheimer (Corder EH, y asociados, La dosis del gen del alelo de apolipoproteína E tipo 4 y el riesgo de la enfermedad de
25 Alzheimer en familias de presentación tardía. *Science* **261**:

páginas 921 a 923 (1993); Corder EH, y asociados, Existe una relación patológica entre el ApoE-epsilon 4 y la enfermedad de Alzheimer. *Arch Neurol.* **52**: páginas 650 a 651 (1995)), la enfermedad de Parkinson (Huang X, y asociados, La apolipoproteína E y la demencia en la enfermedad de Parkinson: un meta-análisis. *Arch Neurol.* **63**: páginas 189 a 193 (2006); Huang X y asociados, El alelo APOE-[epsilon]2 asociado con la prevalencia más alta de la enfermedad esporádica de Parkinson. *Neurology* **62**: páginas 2198 a 2202 (2004); Martinez, M. y asociados, La apolipoproteína E4 es probablemente responsable del pico del enlace del cromosoma 19 para la enfermedad de Parkinson. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **136B**, páginas 172 a 174 (2005)), la enfermedad de Huntington, y una pluralidad de enfermedades y padecimientos menos comunes que ocasionan que declinen las neuronas, por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (Thakkestian A, y asociados, La asociación entre los polimorfismos de la apolipoproteína E y la degeneración macular relacionada con la edad: Una revisión HuGE y un meta-análisis. *Am J Epidemiol.* **164**: páginas 813 a 822 (2006); Bojanowski CM, y asociados, Una variante de la apolipoproteína E puede proteger contra la degeneración macular relacionada con la edad a través de la regulación de la citocina. *Environ Mol Mutagen.* **47**: páginas 594 a 602 (2006)).

25 "Trauma o enfermedad neurológica" incluye, pero no está

limitada a, un resultado después de la lesión de la cabeza (Zhou W, y asociados, Meta-análisis del alelo APOE4 y el resultado después de la lesión traumática del cerebro. *J Neurotrauma*. **25**: páginas 279 a 290 (2008); Lo TY, y
5 asociados, Efecto modulador de los polimorfismos de la apolipoproteína E en el trauma secundario al cerebro y el resultado después del trauma al cerebro en la niñez. *Childs Nerv Syst*. **25**: páginas 47 a 54 (2009)), migraña (Gupta R, y asociados, Polimorfismo en la apolipoproteína E entre los
10 sujetos enfermos de migraña y dolor de cabeza del tipo de tensión. *J Headache Pain*. **10**: páginas 115 a 120 (2009)), edema vasogénico (James ML, y asociados, La apolipoproteína E modifica el resultado neurológico afectando el edema cerebral pero no el tamaño del hematoma después de una hemorragia
15 intracerebral en los humanos. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. **18**: páginas 144 a 149 (2009); James ML, y asociados, Efectos farmacogenómicos de la apolipoproteína E en la hemorragia intracerebral. *Stroke* **40**: páginas 632 a 639 (2009)), etc.

“Enfermedad metabólica” como se usa en la presente
20 descripción, incluye pero no está limitada a, dislipidemia (Wilier CJ, y asociados, Lugares recientemente identificados que influyen en la concentración de lípidos y el riesgo de enfermedad de la arteria coronaria. *Nat Genet*. **40**: páginas 161 a 169 (2008); Bennet AM, y asociados, Asociación de los
25 genotipos de apolipoproteína E con los niveles de lípidos y el

riesgo coronario. *JAMA* **298**: páginas 1300 a 1311 (2007)), enfermedad renal de etapa terminal (Oda H, y asociados, Polimorfismo de la apolipoproteína E y la enfermedad renal. *Kidney Int Suppl.* **71**: página S25 a S27 (1999); Hubacek JA, y
5 asociados, Polimorfismo de la Apolipoproteína E en Pacientes Hemodializados y Controles Sanos. *Biochem Genet.* (2009) Junio 30. [Publicación electrónica antes de la impresión] DOI 10.1007/s10528-009-9266-y.), enfermedad crónica del riñón (Yoshida T, y asociados, Asociación de un polimorfismo del gen
10 de la apolipoproteína E con la enfermedad crónica del riñón en individuos Japoneses con síndrome metabólico. *Genomics* **93**: páginas 221 a 226 (2009); Leiva E, y asociados, Relación entre el polimorfismo de la apolipoproteína E y la neuropatía en pacientes diabéticos tipo-2. *Diabetes Res Clin Pract.* **78**:
15 páginas 196 a 201 (2007)), enfermedad de la vesícula biliar (Boland LL, y asociados, Genotipo de apolipoproteína E y el riesgo de enfermedad de la vesícula biliar en un cohorte basado en una población grande. *Ann Epidemiol.* **16**: páginas 763 a 769 (2006); Andreotti G, y asociados, Polimorfismos de genes en la
20 trayectoria del metabolismo de lípidos y el riesgo de cánceres y piedras del aparato biliar: un estudio del caso de control basado en la población en Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **17**: páginas 525 a 534 (2008)), diabetes melitus (tipo II) (Elosua R, y asociados, La Obesidad Regula la
25 Asociación entre el Genotipo APOE, la Insulina, y la Glucosa en

los Hombres. *Obes Res.* **11**: páginas 1502 a 1508 (2003);
Moreno JA, y asociados, El Promotor del Gen de
Apolipoproteína E (-219G/T), el Polimorfismo Determina la
Sensibilidad a la Insulina en Respuesta a la Grasa Dietética en
5 Adultos Jóvenes Sanos. *J. Nutr.* **135**: páginas 2535 a 2540
(2005)), síndrome metabólico, colelitiasis (Abu Abeid S, y
asociados, El genotipo de la apolipoproteína E y el riesgo de
desarrollar colelitiasis después de una cirugía bariátrica: una
pista para la prevención de la colecistectomía profiláctica de
10 rutina. *Obes Surg.* **12**: páginas 354 a 357 (2002)), etc.

“Enfermedad Psiquiátrica” como se usa en la presente
descripción se refiere a la esquizofrenia (Kampman O, y
asociados, El polimorfismo de la apolipoproteína E está
asociado con la edad de presentación de la esquizofrenia. *J*
15 *Hum Genet.* **49**: páginas 355 a 359 (2004); Dean B. y asociados,
La apolipoproteína E del plasma es disminuida en el espectro
de la esquizofrenia y la enfermedad bipolar. *Psychiatry Res.*
158: páginas 75 a 78 (2008)), enfermedad obsesiva compulsiva
(OCD), comportamiento adictivo (adicción al tabaco, adicción al
20 alcohol, etc.), enfermedad bipolar (Dean B. y asociados, La
apolipoproteína E del plasma es disminuida en el espectro de la
esquizofrenia y la enfermedad bipolar. *Psychiatry Res.* **158**:
páginas 75 a 78 (2008)), y otras enfermedades, desórdenes, y
padecimientos de naturaleza psiquiátrica.

25 “Desarrollo de un padecimiento” como se usa en la

presente descripción se refiere a cualquiera de una diagnosis inicial de una enfermedad, desorden, u otro padecimiento médico, o la exacerbación de una enfermedad, desorden, o padecimiento médico existente para el cual el sujeto ya ha sido
5 diagnosticado.

“Diagnosis” o “pronóstico” como se usa en la presente descripción se refiere al uso de la información (por ejemplo, información genética o datos de otras pruebas moleculares en muestras biológicas, signos y síntomas, descubrimientos en
10 examen físicos, resultados del funcionamiento cognitivo, etc.) para anticipar los resultados más probables, marcos de tiempo, y/o la respuesta a un tratamiento particular para una enfermedad, desorden, o padecimiento determinado, basado en las comparaciones con una pluralidad de individuos que
15 comparten las secuencias de nucleótidos comunes, síntomas, signos, historias familiares, y otros datos relevantes para la consideración de la condición de salud de un paciente.

“Muestra biológica” como se usa en la presente descripción se refiere a un material que se sospecha que
20 contiene el ácido nucleico de interés. Las muestras biológicas que contienen el ADN incluyen cabello, piel, estropajos de las mejillas, y los fluidos biológicos tales como sangre, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, flujo vaginal, feces, orina, fluido espinal, y similares. El aislamiento del ADN de
25 dichas muestras es bien conocido para los expertos en la

técnica.

Un "sujeto" de acuerdo con algunas modalidades es un individuo cuyo genotipo o haplotipo van a ser determinados y registrados en conjunto con los padecimientos individuales (por ejemplo, condiciones de enfermedad o desorden) y/o respuesta al fármaco o tratamiento candidato. Las secuencias de los nucleótidos de una pluralidad de sujetos son utilizadas para construir un árbol filogenético, y luego las secuencias análogas de nucleótidos de un sujeto individual pueden ser comparadas con las que se encuentran en el árbol filogenético para propósitos de diagnóstico y pronóstico.

"Gen" como se usa en la presente descripción significa un segmento de ADN que contiene toda la información para la biosíntesis regulada de un producto de ARN, incluyendo promotores, exones, intrones, y otras regiones sin traducir que controlan la expresión.

"Lugar genético" o "lugar" como se usa en la presente descripción significa un lugar en un cromosoma o molécula de ADN, que con frecuencia corresponde a un gen o a una característica física o fenotípica o a un nucleótido particular o al estiramiento de nucleótidos. Lugar es la forma plural de lugar.

"Amplificación", es aplicada a los ácidos nucleicos de la presente descripción y se refiere a cualquier método que da como resultado la formación de una o más copias de un ácido

nucleico, en donde preferentemente la amplificación es exponencial. Uno de dichos métodos para la amplificación enzimática de las secuencias específicas de ADN es conocida como la reacción de cadena de polimerasa (PCR), como lo describen Saiki y asociados, 1986, en Science 230: páginas 1350 a 1354. Los cebadores utilizados en los estudios de PCR generalmente varían de longitud de aproximadamente 10 a 50 o más nucleótidos, y generalmente son seleccionados para que sean de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos para asegurar la especificidad suficiente. El fragmento de hilo doble que es producido es denominado un "amplicón" y puede variar de longitud de unos cuantos como de aproximadamente 30 nucleótidos, a 20,000 o más.

Un "marcador" o "marcador genético" como se usa en la presente descripción es una variación conocida de una secuencia de ADN en un lugar particular. La variación puede estar presente en un individuo debido a la mutación o herencia. Un marcador genético puede ser una secuencia de ADN corta, tal como una secuencia que rodea un cambio de un solo par básico (polimorfismo de un solo nucleótido, SNP), o uno largo, como minisatélites. Los marcadores pueden ser utilizados para estudiar la relación entre una enfermedad heredada y su causa genética (por ejemplo, una mutación particular de un gen que da como resultado una forma de proteína defectuosa o de otra manera indeseable).

Un "factor de riesgo genético" como se usa en la presente descripción significa un marcador genético que está asociado con la susceptibilidad aumentada a un padecimiento, enfermedad, o desorden. También se puede referir a un
5 marcador genético que está asociado con una respuesta particular a un fármaco o tratamiento de interés seleccionado.

"Asociado con" como se usa en la presente descripción significa la ocurrencia junto con dos o más características más frecuentes que se esperarían por oportunidad sola. Un ejemplo
10 de asociación comprende una característica en la superficie de las células de los glóbulos blancos denominada HLA (la HLA permanece para el antígeno de leucocitos humano). Un tipo de HLA particular, el HLA de tipo B-27, está asociado con riesgo aumentado para un número de enfermedades incluyendo la
15 espondilitis alquilosante. Es 87 veces mucho más probable que ocurra la espondilitis alquilosante en gente con HLA B-27 que en la población general.

Un sujeto "con riesgo aumentado de desarrollar un padecimiento" debido a un factor de riesgo genético es uno el
20 cual está predispuesto al padecimiento, tiene susceptibilidad genética para el padecimiento, y/o es más probable que desarrolle el padecimiento que los sujetos en los cuales está ausente el factor de riesgo genético. Por ejemplo, un sujeto quien se encuentra en "un riesgo aumentado de desarrollar la
25 enfermedad de Alzheimer" debido a la presencia de uno o dos

alelos ApoE 4 es más probable que desarrollen la enfermedad de Alzheimer que un sujeto que no es portador de un alelo ApoE 4.

“Polimorfismo” como se usa en la presente descripción se refiere a la existencia de dos o más secuencias de nucleótidos diferentes en un lugar particular en el ADN del genoma. Los polimorfismos pueden servir como marcadores genéticos y también nos podemos referir a ellos como variantes genéticas. Los polimorfismos incluyen substituciones, inserciones, eliminaciones y microsatélites de nucleótidos, y pueden, pero no necesariamente, resultar en diferencias que se pueden detectar en la expresión del gen o la función de la proteína. Un sitio polimórfico es una posición del nucleótido dentro de un lugar en el cual la secuencia de nucleótidos varía de una secuencia de referencia en por lo menos un individuo en una población.

Un “polimorfismo de eliminación/inserción” o “DIP” como se usan en la presente descripción es una inserción de uno o más nucleótidos en una versión de una secuencia en relación con otra. Si es conocido cual de los alelos representa los alelos menores, el término “eliminación” es utilizado cuando el alelo menor es una eliminación de un nucleótido, y el término “inserción” es utilizado cuando el alelo menor es agregado de un nucleótido. El término “polimorfismo de eliminación/inserción” también es utilizado cuando existen

formas múltiples o longitudes y el alelo menor no se puede apreciar. Por ejemplo, para los polimorfismos poli-T aquí descritos, se observan longitudes múltiples de los polimorfismos.

- 5 "Datos de polimorfismo" como se usan en la presente descripción significan información con respecto a uno o más de los siguientes para un gen específico: ubicación de los sitios polimórficos; variación de secuencia en dichos sitios; frecuencia de polimorfismos en una o más poblaciones; 10 diferentes genotipos y/o haplotipos determinados por el gen; frecuencia de uno o más de estos genotipos y/o haplotipos en una o más poblaciones; y cualquier asociación conocida entre características y un genotipo o un haplotipo para el gen.

- "Haplotipo" como se usa en la presente descripción se 15 refiere a una variante genética o combinación de variantes portadas en al menos un cromosoma de un individuo. El haplotipo con frecuencia incluye lugares polimórficos contiguos múltiples. Todas las partes del haplotipo como se usan en la presente descripción ocurren en la misma copia de un 20 cromosoma o una molécula haploide de ADN. Ausente de la evidencia por el contrario, un haplotipo se presume que representa una combinación de lugares múltiples que es probable que sean transmitidos juntos durante la meiosis. Cada humano porta un par de haplotipos para un lugar genético 25 determinado, consistiendo de secuencias heredadas en los

cromosomas homólogos de los dos padres. Estos haplotipos pueden ser idénticos o pueden representar dos variantes genéticas diferentes para un lugar determinado. La haplotipificación es un proceso para determinar uno o más haplotipos en un individuo. La haplotipificación puede incluir el uso de antecedentes familiares, técnicas moleculares y/o interferencia estadística.

Una "variante", "variación" o "variante genética" como se usan en la presente descripción, se refiere a una isoforma específica de un haplotipo en una población, difiriendo la forma específica de otras formas del mismo haplotipo en la secuencia de por lo menos una, y frecuentemente más de una de un sitio de variantes o nucleótidos dentro de las secuencias del gen. Las secuencias en estos sitios variantes que difieren entre los alelos diferentes de un gen son denominadas "variantes de secuencias del gen", "alelos", "variaciones" o "variantes." El término "forma alternativa" se refiere a un alelo que puede ser distinguido de otros alelos por tener por lo menos uno y frecuentemente más de uno, sitios variantes dentro de la secuencia del gen. Otros términos conocidos en la técnica como equivalentes a las "variaciones" o "variantes" incluyen las mutaciones y los polimorfismos solos de los nucleótidos (SNP). La referencia a la presencia de una variación o variaciones significa variaciones particulares, por ejemplo, nucleótidos particulares en sitios polimórficos particulares, en vez de

justamente la presencia de cualquier variación en el gen.

“Isoforma” como se usa en la presente descripción significa una forma particular de un gen, mRNA, cADN o la proteína codificada por los mismos, distinguida de otras formas por su secuencia y/o estructura particular. Por ejemplo, la isoforma ApoE 4 de la apolipoproteína E es opuesta a las isoformas ApoE 2 o ApoE 3.

“Cistrón” como se usa en la presente descripción significa una sección del ADN encontrada en un solo cromosoma que contiene el código genético para un polipéptido solo y las funciones como una unidad hereditaria. Un cistrón incluye exones, intrones, y elementos regulatorios relacionados con una unidad funcional sola (por ejemplo, un gen). El término se deriva de la prueba clásica de *cis-trans* para determinar si los elementos genéticos podían interactuar funcionalmente en forma independiente de si ellos estaban localizados en la misma molécula de ADN (complementación “*trans*”) o solamente cuando eran localizados en la misma molécula de ADN (elementos de acción “*cis*”).

El término “genotipo” en el contexto de la presente invención se refiere a la forma alélica particular de un gen, la cual puede ser definida por los nucleótidos particulares presentes en una secuencia de ácido nucleico en un sitio particular. El genotipo también puede indicar el par de alelos presentes en uno o más lugares polimórficos. Para organismos

liploides, tales como humanos, dos haplotipos forman un genotipo. La genotipificación es cualquier proceso para determinar un genotipo de un individuo, por ejemplo, mediante la amplificación de ácido nucleico, el enlace de anticuerpos, u
5 otros análisis químicos. El genotipo resultante puede no tener fases, significando que las secuencias encontradas no son conocidas para ser derivadas de un cromosoma paterno o el otro.

“Desequilibrio de enlace” como se usa en la presente
10 descripción significa una asociación no aleatoria de alelos en dos o más lugares. El desequilibrio de enlace describe una situación en la cual algunas combinaciones de los alelos o marcadores genéticos ocurren más o menos frecuentemente en una población de lo que se podía esperar de una formación
15 aleatoria de haplotipos de los alelos basados en sus frecuencias. La asociación no aleatoria entre los polimorfismos en lugares diferentes es medida por el grado del desequilibrio de enlace.

“Alineación de secuencias múltiples” o “MSA” como se usa
20 en la presente descripción significan la alineación de tres o más secuencias de nucleótidos de un ADN genómico derivado de una pluralidad de individuos para determinar la homología y heterología entre las secuencias. En general, el conjunto de preguntas de entrada de las secuencias se supone que tienen
25 una relación de evolución por medio de la cual comparten un

linaje y que son descendientes de un antepasado común. Los algoritmos de computadora son los más frecuentemente utilizados para realizar el análisis de las secuencias alineadas.

Algunas modalidades de la presente invención se describen con referencia a los diagramas de bloques que ilustran los métodos (por ejemplo, figura 1), la cual puede incluir los pasos implementados por una computadora y/o productos de programa de computadora. Deberá quedar entendido que cada bloque de los diagramas de bloques y/o ilustraciones de operación, y combinaciones de bloques en los diagramas de bloques y/o ilustraciones de operación, pueden ser implementados mediante el equipo análogo y/o digital, y/o las instrucciones del programa de cómputo. Estas instrucciones del programa de cómputo pueden ser proporcionadas a un procesador de una computadora de uso general, una computadora de propósitos especiales, ASIC, y/u otros aparatos de procesamiento de datos programables, de modo que las instrucciones, las cuales se ejecutan por medio del procesador de la computadora y/u otros aparatos de procesamiento de datos programables. Crean medios para implementar las funciones/acciones especificadas en los diagramas de bloques y/o las ilustraciones de operación. Por consiguiente, se deberá apreciar que los diagramas de bloques y las ilustraciones de operación soportan los aparatos, métodos y productos del programa de cómputo.

También puede estar incluido otro software, tal como un sistema operativo. Se apreciará adicionalmente que la funcionalidad del módulo de alineación de secuencias múltiples, el mapeo del modulo y/u otros módulos aquí descritos pueden
5 ser incorporados, por lo menos en parte, utilizando componentes del equipo separados, uno o más Circuitos Integrados Específicos de Aplicación (ASIC) y/o uno o más procesadores y/o computaras digitales de propósitos especiales.

10 "Mapeo" como se usa en la presente descripción significa crear un árbol filogenético asignando un nodo a cada variante nueva de una secuencia de nucleótidos observada, conectando ese nodo a otro nodo representando una secuencia conocida portada por el mismo individuo en el cromosoma o cistrón, y
15 contando los números de cada tipo del sujeto representado en cada nodo. Ver la figura 4 para un ejemplo del árbol filogenético desarrollado de esta manera.

"Filogenético" significa en relación con el estudio de las conexiones de evolución entre varios grupos de organismos o
20 individuos dentro de las especies. Antes de que la información genética estuviera disponible fácilmente, la filogenia fue observada en su mayor parte en la observación fenotípica. "Mapeo filogenético" como se usa en la presente descripción significa el uso de los datos de la secuencia de ADN para
25 conectar las variantes relacionadas de las secuencias portadas

por una pluralidad de individuos con el objeto de determinar las conexiones de evolución y la cronología de divergencia. Un "árbol filogenético" es el resultado del mapeo de las conexiones entre las variantes.

5 "Nodo" como se usa en la presente descripción significa un punto de datos del polimorfismo en un árbol filogenético que representa una secuencia actual variante portada por al menos un sujeto. Un nodo es conectado por una rama a otro nodo representando una secuencia variante portada por el mismo
10 individuo en el mismo cromosoma y en el mismo cistrón pero en diferentes lugares genéticos dentro del cistrón. La presencia del nodo indica que por lo menos un sujeto portaba ambas secuencias indicadas por el nodo así como la secuencia representada por el nodo vecino al cual está conectada por una
15 rama.

 "Rama" como se usa en la presente descripción significa una conexión entre dos nodos que representan dos secuencias o haplotipos variantes diferentes, en donde las dos variantes están localizadas en el mismo cromosoma y en el mismo cistrón
20 de un sujeto individual. "Punto de ramificación" significa cualquier nodo desde el cual más de dos ramas se extienden, pero que es especialmente utilizado en esta descripción para referirse a un nodo de raíz del cual se extienden tres o más nodos. Un "nodo de raíz" representa la secuencia genética de
25 evolución de un antepasado común del cual ha generado la

variedad de la divergencia genética de las variantes de la secuencia cercana representada por los nodos conectados.

“Iterativamente” como se usa en la presente descripción se refiere al cálculo repetitivo de valores para cada carácter en una serie. Por ejemplo, cada nodo en un árbol filogenético es analizado para calcular la proporción del número de sujetos afectados con un padecimiento de interés (tal como la enfermedad de Alzheimer) para controlar a los sujetos no afectados; esta proporción es comparada con los nodos conectados para localizar las correlaciones con el riesgo aumentado o disminuido para desarrollar una enfermedad, desorden, o padecimiento de interés. Un cambio substancial en esta proporción entre un nodo y el siguiente indica la presencia de una variante de cualesquiera aumentos o disminuciones del riesgo de la presentación más temprana de la enfermedad. “Examen iterativo de las variantes genéticas” significa el comienzo del análisis representando los nodos las secuencias compartidas por los números mayores de sujetos individuales y analizando sucesivamente los nodos conectados por las ramas que se extienden desde ese nodo, seguido por el segundo nivel de nodos, y así sucesivamente. Entonces el análisis se mueve en general desde las raíces del árbol hacia las ramas exteriores y los nodos del árbol.

“Tratamiento” como se usa en la presente descripción incluye cualquier fármaco, procedimiento, cambio en el estilo de

vida, u otro ajuste introducido en el intento para efectuar un cambio en un aspecto particular de la salud del sujeto (por ejemplo, dirigido a una enfermedad, desorden, o padecimiento particular).

5 “Fármaco” como se usa en la presente descripción se refiere a una entidad química o producto biológico, o combinación de entidades químicas o productos biológicos, administrados a una persona para tratar o prevenir o controlar una enfermedad o padecimiento. El término “fármaco” como se
10 usa en la presente descripción es sinónimo de los términos “medicina”, “medicamento”, “intervención terapéutica”, o “producto farmacéutico”. Más preferiblemente el fármaco es aprobado por una agencia gubernamental para el tratamiento de por lo menos una enfermedad o padecimiento específico.

15 “Enfermedad”, “desorden”, y “padecimiento” son reconocidos comúnmente en la técnica y designan la presencia de signos y/o síntomas en un individuo o paciente que son conocidos generalmente como anormales y/o indeseables. Las enfermedades o padecimientos pueden ser diagnosticados y
20 categorizados basados en los cambios patológicos. La enfermedad o padecimiento puede ser seleccionado de los tipos de enfermedades de la lista de los textos estándar tales como Principios de Medicina Interna de Harrison, 1997, o Base Patológica de la Enfermedad de Robbins, 1998.

25 “Disfunción de la mitocondria” como se usa en la presente

descripción significa cualesquiera anormalidades perjudiciales de la mitocondria dentro de una célula o células. Algunas enfermedades, desórdenes, o padecimientos conocidos actualmente en la técnica como que están asociados con la

5 disfunción de la mitocondria incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y otras enfermedades neurodegenerativas, la lesión por reperfusión-isquemia en los ataques y ataques al corazón, epilepsia, diabetes, y envejecimiento. Muchas otras enfermedades, desórdenes, y

10 padecimientos han estado asociados con la disfunción de la mitocondria en la técnica. Indudablemente, la mitocondria es crítica para el funcionamiento correcto de la mayor parte de los tipos de células, y la declinación de la mitocondria con frecuencia conduce a la muerte de la célula. Esta disfunción de

15 la mitocondria ocasiona el daño de la célula y la muerte comprometiendo la producción de ATP, interrumpiendo la homeostasis de calcio y aumentando el esfuerzo oxidativo. Además, el daño a la mitocondria puede conducir a la muerte apoptótica de la célula ocasionando la liberación del citocroma

20 c y otros factores pro-apoptóticos dentro del citoplasma (para revisar, consultar Wallace, 1999; Schapira, 2006). Con respecto a un ejemplo específico aquí encontrado, las isoformas ApoE 3 y ApoE 4 se hipotetiza que ocasionan la disfunción de la mitocondria a través de las interacciones con el gen TOMM40.

25 Algunas variantes del gen TOMM40 pueden actuar

sinérgicamente con las isoformas ApoE 3 para acelerar la
declinación de la mitocondria. Este mecanismo de la
mitocondria se considera que contribuye a muchas
enfermedades genéticas complejas, desórdenes, y
5 padecimientos.

"Sujetos" como se usa en la presente descripción
preferentemente son, pero no están limitados a, sujetos
humanos. Los sujetos pueden ser hombres o mujeres y pueden
ser de cualquier raza o etnicidad, incluyendo, pero sin limitarse
10 a, Caucásicos, Afro-Americanos, Africanos, Asiáticos, Hispanos,
Indios, etc. Los sujetos pueden ser de cualquier edad,
incluyendo recién nacidos, neonatos, infantes, niños,
adolescentes, adultos, y geriátricos. Los sujetos también
pueden incluir sujetos animales, particularmente sujetos
15 mamíferos tales como caninos, felinos, bovinos, caprinos,
equinos, ovinos, porcinos, roedores (por ejemplo, ratas y
ratones), lagomorfos, primates (incluyendo primates no
humanos), etc., seleccionados por la medicina veterinaria o con
propósitos de desarrollo de fármacos farmacéuticos.

20 "Tratar", "tratando", o "tratamiento" como se usa en la
presente descripción se refiere a cualquier tipo de medida que
imparte un beneficio a un paciente afligido con una enfermedad,
incluyendo la mejora en las condiciones del paciente (por
ejemplo, en uno o más síntomas), la demora de la presentación
25 o progreso de la enfermedad, etc.

“Enfermedad de Alzheimer de Presentación Tardía” o “LOAD” como se usa en la presente descripción es conocida en la técnica, y es una clasificación utilizada si la enfermedad de Alzheimer tiene una presentación o es diagnosticada después
5 de la edad de 65 años. Esta es la forma más común de la enfermedad de Alzheimer.

2. Métodos para Identificar las Variantes Genéticas

Aunque las listas de asociaciones derivadas de las exploraciones a nivel genómico son útiles, son generalmente
10 inadecuadas para explicar la complejidad de la enfermedad. Las familias, trayectorias, e interacciones de los genes pueden proporcionar especificidades. El mapeo de variantes de alta resolución puede revelar respuestas a las interacciones genéticas complejas. Esto es particularmente aplicable en
15 donde un factor de riesgo genético conocido el cual no explica completamente por el mismo una asociación con la enfermedad, desorden, o padecimiento de interés puede presentar un lugar genético candidato excelente para investigaciones más detalladas. Además, la farmacogenética, aunque es útil para el
20 desarrollo de fármacos, también puede extender la importancia biológica. El análisis de los datos de la secuencia de números grandes de individuos para descubrir las variaciones en la secuencia del gen entre individuos en una población dará como resultado la detección de una fracción mayor de todas las
25 variantes en la población.

La información inicial de la secuencia que va a ser analizada por el método de la presente invención es derivada del ADN genómico de una pluralidad de sujetos. El organismo puede ser cualquier organismo para el cual están disponibles

5 secuencias múltiples, pero es preferentemente de los humanos. Para identificar nuevas variaciones con frecuencia es útil seleccionar grupos de población diferentes basados en la raza, etnicidad, género y/u origen geográfico debido a que las variaciones particulares pueden diferir en frecuencia entre

10 dichos grupos. Más preferentemente, las enfermedades o desórdenes que se considera que son multigenéticos (enfermedades/desórdenes genéticamente complejos), los fenotipos representados por la población de sujetos son desde los extremos de un espectro. Las muestras biológicas que

15 contienen el ADN pueden ser sangre, semen, estropajo de las mejillas, etc. El aislamiento del ADN de dichas muestras es bien conocido en la técnica.

En algunas modalidades, la presente invención se refiere al análisis de los datos de las secuencias de nucleótidos de una

20 pluralidad de sujetos que tienen por lo menos un factor de riesgo conocido para una enfermedad, desorden, o padecimiento determinado (genético o de otra manera). Las secuencias de nucleótidos son analizadas para generar los datos del haplotipo, y los haplotipos o variantes genéticas son

25 entonces mapeados en un árbol filogenético para demostrar la

evolución de las secuencias representadas. Al comparar este árbol con los datos del fenotipo acerca de la pluralidad de sujetos, es posible un pronóstico o diagnóstico para un sujeto individual portador de haplotipos observados en el árbol
5 filogenético.

En otras modalidades, la presente invención se refiere a los campos de farmacogenéticos y farmacogenómicos y al uso de la información del haplotipo genético para pronosticar la susceptibilidad de un individuo a la enfermedad y/o sus
10 respuestas a un fármaco o fármacos particulares, de modo que los fármacos diseñados para las diferencias genéticas de los grupos de población pueden ser desarrollados y/o administrados a individuos con el perfil genético apropiado.

La información de la secuencia de nucleótidos es derivada
15 del ADN genómico. Los datos de la secuencia genómica utilizados pueden ser obtenidos de la clínica o animales no humanos o de células cultivadas o estudios de tejidos aislados. El organismo puede ser cualquier organismo para el cual están disponibles secuencias múltiples, pero preferentemente es de
20 los humanos. Al identificar nuevas variaciones con frecuencia útiles para seleccionar diferentes grupos de población basados en la raza, etnicidad, género, y/u origen geográfico debido a que las variaciones particulares pueden diferir en frecuencia entre dichos grupos. Más preferentemente, para las
25 enfermedades o desórdenes considerados como multigénicos

(enfermedades/desórdenes complejos genéticamente), los fenotipos representados por la población del sujeto son los extremos opuestos.

Las muestras biológicas que contienen ADN pueden ser de
5 sangre, semen, estropajo de las mejillas, etc. El aislamiento del
ADN de dichas muestras es bien conocido en la técnica. Los
métodos para determinar la secuencia de ADN en un lugar de
interés genético particular también es conocido en la técnica.
La elaboración de secuencias automáticas está ahora
10 ampliamente disponible y requiere solamente una muestra
aislada de ADN y por lo menos un cebador que está diseñado
específicamente para reconocer una secuencia altamente
conservada dentro o en la proximidad cercana al lugar genético
de interés.

15 De acuerdo con algunas modalidades, una región o lugar
de interés genético definido (por ejemplo, definido por un
conjunto de cebadores PCR directos e inversos) se forman las
secuencias cuidadosamente de un cohorte de gente incluyendo
los pacientes que son bien caracterizados para una enfermedad
20 particular.

Se determinó una secuencia de consenso, y todas las
variantes de las secuencias observadas para un lugar genético
determinado son recopiladas en una lista. Los lugares que
tienen el número mayor de variantes observadas representan la
25 divergencia de evolución de un antepasado común. Como tales,

estos lugares están conectados en *cis* a los lugares que tienen solamente una o muy pocas variantes observadas. Durante las fases iniciales de investigación por lo menos, se prefiere que las poblaciones sean analizadas en grupos de sujetos que
5 comparten un fenotipo general común representando una ascendencia similar. De otra manera, el análisis de estos datos a través de la construcción de árboles filogenéticos requerirá un número prohibitivamente grande de sujetos.

3. Alineaciones de secuencias múltiples.

10 La determinación de la presencia de una variación particular o una pluralidad de variaciones es un gen o una región del gen en una población que puede ser realizada de una variedad de modos, y todos ellos comprenden la ubicación del lugar genético particular teniendo como objetivo las secuencias
15 dentro de la región de interés que son conocidas que son ampliamente conservadas. Desde el lugar altamente conservado, las secuencias contiguas son fácilmente obtenidas a través de una de muchas técnicas bien conocidas en el arte.

El primer paso para analizar las secuencias paralelas de
20 ADN de una pluralidad de sujetos es la alineación de secuencias múltiples ("MSA"). La MSA es generalmente utilizada para mostrar la alineación de la secuencia de las muestras homólogas con diferencias polimórficas dentro de genes o regiones de genes para mostrar las áreas conservadas
25 y las secuencias variantes. La MSA de la información de la

secuencia obtenida en el lugar de interés puede ser construida utilizando una o más de varias técnicas conocidas y un software públicamente disponible, y están disponibles públicamente desde muchas fuentes incluyendo la Internet. Los métodos para
5 analizar las alineaciones de secuencias múltiples conocidos en el arte incluyen, por ejemplo, los que se describen en la Patente Norteamericana No. 6,128,587 otorgada a Sjolander; la Patente Norteamericana No. 6,291,182 otorgada a Schork y asociados; y la Patente Norteamericana No. 6,401,043 otorgada
10 a Stanton y asociados.

4. Árbol filogenético y análisis.

Varios métodos para la construcción de “árboles filogenéticos” son conocidos en la técnica (Ver, por ejemplo, Sanderson, 2008). Sun y asociados, utilizaron el análisis de
15 “bloque de haplotipo” para estudiar las asociaciones entre las variantes de receptores similares a casetas de peaje (TLR) y el cáncer de próstata (2005) y la publicación de Bardel y asociados (2005) utilizaron un método de análisis cladístico para investigar las asociaciones entre las variantes del gen
20 CARD15 y la enfermedad de Crohn. Sin embargo, no se utilizaron los lugares genéticos anteriormente asociados con la enfermedad para investigar los enlaces.

Los árboles filogenéticos de acuerdo con algunas modalidades pueden ser contruidos con una topología en la
25 cual las variantes de la secuencia de haplotipo observadas en

sujetos humanos individuales de las formas de nodos estudiadas (representando cada una la secuencia observada en los datos) en un árbol. Los nodos pueden ser unidos a otros nodos, y el antepasado común es encontrado en el sitio de ramificación, la raíz común o el nodo de la raíz del árbol. Un árbol filogenético refleja las relaciones de evolución entre los lugares genéticos para los cuales son analizados los datos (ver las publicaciones de Sanderson, 2008; Tzeng, 2005; Seltman, 2003). La figura 4 muestra un árbol filogenético detallado construido para la Región B del lugar genético mostrado en la figura 3.

El punto de partida para el cálculo del árbol filogenético es generalmente un MSA (ver párrafos anteriores). Las aplicaciones de software múltiples están disponibles para la construcción de los árboles filogenéticos basados en los datos de la secuencia. Ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 7,127,466 y la Patente Norteamericana No. 6,532,467 otorgadas a Brocklebank, y asociados, La premisa básica es que el lugar genético que exhibe muchas variaciones es representado por estas variantes conectadas en *cis*. Los polimorfismos crean puntos de ramificación (nodos) en el árbol que definen grupos de secuencias o haplotipos relacionados.

El árbol filogenético es utilizado para información por medio de las proporciones de sujetos de examen iterativo afectados con un padecimiento para sujetos de control no

afectados; los cálculos comienzan con los nodos observados en los números mayores de sujetos y se mueven hacia la periferia del árbol a los nodos observados en menos sujetos. La meta es localizar un punto de ramificación, rama, o nodo en donde
5 exista un cambio substancial en la proporción de los sujetos afectados con un padecimiento de interés para los sujetos de control no afectados. Dicho punto de ramificación representa la divergencia de evolución de los sujetos del riesgo más alto de los sujetos del riesgo más bajo o viceversa.

10 El análisis estadístico del árbol filogenético generado puede ser realizado de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Un método reconocido en la técnica es el cálculo de los niveles de confianza de la oreja o tirante (consultar la publicación de Efron y asociados, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA
15 93, páginas 13429 a 13434 (1996)).

5. Evaluación del paciente.

Una vez que el árbol filogenético ha sido generado para un lugar genético particular, un sujeto individual puede ser evaluado comparando su secuencia de ADN con las secuencias
20 que comprenden el árbol filogenético. La presencia de haplotipos o variantes de secuencias correspondientes con las regiones del árbol que representan los sujetos con la incidencia más alta del padecimiento de interés (por ejemplo, proporciones altas de sujetos afectados con la enfermedad o desorden a
25 sujetos de control no afectados) significaría que el sujeto

individual también se encuentra en un riesgo aumentado. Por el contrario, las proporciones substancialmente más bajas corresponden al riesgo reducido de desarrollar el padecimiento de interés.

- 5 Los árboles filogenéticos también pueden ser analizados basados en la capacidad de respuesta del padecimiento de interés al tratamiento con un agente activo o un método de tratamiento de interés de acuerdo con algunas modalidades.

6. APOE y TOMM40.

- 10 Los fenotipos y genotipos ApoE son bien conocidos en la técnica. El sistema establecido de nomenclatura así como los fenotipos y genotipos para ApoE se describen en, por ejemplo, la publicación de Zannis y asociados, 1982, la cual está incorporada a la presente descripción como referencia.

- 15 También son conocidos los fenotipos y genotipos del gen TOMM40 (La Subunidad del Canal de Membrana Exterior de la Mitocondria, 40 kDa). Las funciones del gen TOMM40 es una subunidad formadora de canal de la translocasa encontrada en la membrana de la mitocondria que es esencial para importar la
- 20 proteína dentro de la mitocondria.

- Los datos de exploración de asociación a nivel genoma de los estudios de los pacientes de la enfermedad de Alzheimer han identificado de manera inequívoca la región de desequilibrio del enlace que contiene el gen de la
- 25 apolipoproteína E (ApoE). La variante ApoE 4 ha sido duplicada

ampliamente como un gen de susceptibilidad confirmada desde las publicaciones iniciales en 1993 (ver, por ejemplo, Corder y asociados). Sin embargo, los datos de exploración de asociación a nivel genoma resultaron en una "coincidencia" notable observada en los estudios de biología de la célula que comprenden la co-localización del alelo ApoE y el gen TOMM40 para la membrana externa de la mitocondria. Este otro gen, TOMM40, fue encontrado primero durante los estudios del desequilibrio del enlace de modelación alrededor del alelo ApoE en 1998. Los polimorfismos fueron localizados adyacentes al alelo ApoE dentro de una región de desequilibrio de enlace pequeña.

El alelo ApoE co-localiza la membrana externa de la mitocondria, sugiriendo interacciones específicas de la isoforma que conduce a un rol potencial para la apoptosis de la mitocondria inducida por el ApoE como una expresión de la enfermedad de Alzheimer en una etapa temprana. Los datos biológicos han demostrado que la proporción de mitocondria móvil en un cultivo de células de las neuronas, así como la velocidad en la cual se mueven y la distancia que atraviesa, son factores que afectan la apoptosis aumentada de la mitocondria. Los datos filogenéticos sugieren un efecto genético independiente en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer por el gen TOMM40.

El alelo ApoE se enlaza específicamente a la mitocondria

en los cultivos de neuronas humanas (Chang, 2005), y elaboran la secuencia de esta región de desequilibrio del enlace en cientos de pacientes de enfermedad de Alzheimer y los controles cotejados, combinados con el mapeo de la evolución de la variante genética del gen TOMM40, se define una región de interés particular para las interacciones de ApoE-TOMM40, como se muestra en la figura 3. Estos datos de evolución soportan adicionalmente la asociación genética entre el alelo ApoE y el gen TOMM40, y sugieren que la disfunción de la mitocondria podría ser responsable de la muerte de las neuronas que ocurre lentamente con el paso de los años. La edad de la distribución de presentación para la enfermedad de Alzheimer (ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana 6,027,896 otorgada a Roses y asociados) podría reflejar la herencia de las variantes enlazadas estrechamente de dos proteínas que interactúan bioquímicamente que conducen a la expresión clínica de la enfermedad.

Como se detalló en la presente descripción, la interacción entre los haplotipos múltiples de las variantes del gen TOMM40 y los alelos ApoE contribuyen a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer; en particular, los haplotipos del gen TOMM40 en el enlace con un alelo E 3 de ApoE contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Varias de las variantes del gen TOMM40 evolucionaron solamente enlazadas a *cis* para el alelo ApoE 3. (De un modo similar, las variantes específicas del gen

TOMM40 pueden haber evolucionado enlazadas-*cis* a los alelos ApoE 4 o ApoE 2). Por lo tanto, cualquier efecto genético agregado de las variantes del gen TOMM40 segrega independientemente del alelo ApoE 4, pero los dos productos de la proteína variante pueden interactuar funcionalmente, en *trans*, para producir un fenotipo o carácter determinado que se puede observar. Por lo tanto, cualquier efecto genético de las variantes del gen TOMM40 segrega independientemente del alelo ApoE 4. Esta "coincidencia" de los genes que interactúan adyacentes pueden ser responsables de los datos de asociación estadística extraordinariamente importantes encontrados en todos los estudios de exploración de asociación a nivel genoma de la enfermedad de Alzheimer. Es de interés observar que las plataformas de exploración de la asociación a nivel genoma iniciales disponibles comercialmente no contienen polimorfismos ApoE algunos, pero fueron identificados con el gen TOMM40 y el SNP del alelo ApoC1, pero la región es a la que siempre nos referimos virtualmente como la "región ApoE".

Estos datos, los cuales combinan la genética de la enfermedad y los mecanismos moleculares putativos de la patogénesis, pueden ser vistos también dentro del contexto de la farmacogenética. Debido al efecto genético fuerte de heredar un alelo ApoE 4. Al alelo ApoE 4 nos hemos referido como un gen de susceptibilidad compleja por más de una década. Las duplicaciones consistentes de la edad de las distribuciones de

presentación como una función del genotipo ApoE confirman que el rol de herencia del ApoE 3 no es totalmente benigno, pero que el factor de riesgo es más bajo observado en una cantidad más pequeña de la presentación de la enfermedad.

5 Existen variantes genéticas del gen TOMM40 que están localizadas solamente en los hilos del ADN que contienen el alelo ApoE 3 en las regiones de desequilibrio del enlace (Roses y asociados, datos no publicados), y por lo tanto no en el equilibrio de Hardy-Weinberg como fue requerido por el SNP de

10 los páneles de asociación a nivel genoma. Los cambios de evolución en las secuencias del gen TOMM40 que están enlazados-*cis* solamente al alelo ApoE 3 actúan para aumentar el riesgo de la enfermedad de Alzheimer asociado con el alelo ApoE 3, mientras que otras variantes del gen TOMM40

15 enlazadas-*cis* al alelo ApoE 3 disminuyen el riesgo asociado con el alelo ApoE 3. Una prueba genética independiente sería determinar si aquellos polimorfismos del gen TOMM40 asociados con menos segregado de la enfermedad de Alzheimer en una edad tardía en la edad de los trazos de distribución de

20 presentación para los genotipos que contienen el alelo ApoE 3 [ApoE 3/3 o ApoE 4/3].

Detectando la presencia o ausencia de los alelos ApoE 2, 3 ó 4, y/o los haplotipos del gen TOMM40 o del ADN que codifica los mismos (incluyendo, en algunas modalidades, el

25 número de alelos para cada uno) en un sujeto puede ser llevado

a cabo ya sea directa o indirectamente por cualesquiera medios adecuados. Una variedad de técnicas son conocidas para los expertos en el arte. Todas generalmente comprenden el paso de recolectar una muestra del material biológico que contiene cualquier ADN o proteína del sujeto, y luego detectar si el sujeto posee o no el haplotipo de interés. Por ejemplo, el paso de detección con respecto al alelo ApoE puede llevarse a cabo recolectando una muestra del alelo ApoE del sujeto (por ejemplo, del líquido cerebroespinal, o cualquier otro fluido o tejido que contiene el alelo ApoE), y luego determinando la presencia o ausencia de una isoforma ApoE 2, 3, ó 4 en la muestra del alelo ApoE (por ejemplo, mediante el enfoque o inmunoensayo isoeléctrico).

La determinación de la presencia o ausencia del ADN que codifica una isoforma ApoE y/o TOMM40 puede ser llevada a cabo mediante la elaboración de secuencias directa de la región del interés del ADN genómico, con una muestra de oligonucleótido etiquetada con un grupo adecuado que se puede detectar, y/o por medio de una reacción de amplificación tal como una reacción de cadena de polimerasa o una reacción de cadena de ligasa (cuyo producto de la reacción de amplificación puede entonces ser detectado con una muestra de oligonucleótido etiquetada o un número de otras técnicas). Además, el paso de detección puede incluir el paso de detectar si el sujeto es heterozigo u homozigo para el gen que codifica

el alelo ApoE y/o el haplotipo del gen TOMM40. Se conocen ensayos de muestra de oligonucleótidos diferentes numerosos los cuales pueden ser empleados para llevar a cabo la presente invención. Ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 5 4,302,204 otorgada a Wahl y asociados; la Patente Norteamericana No. 4,358,535 otorgada a Falkow y asociados; la Patente Norteamericana No. 4,563,419 otorgada a Ranki y asociados; y la Patente Norteamericana No. 4,994,373 otorgada a Stavrianopoulos y asociados (los solicitantes específicamente 10 pretenden que las descripciones de todas las referencias de Patente Norteamericana aquí citadas sean incorporadas a la presente descripción como referencia).

En algunas modalidades, la detección puede incluir la amplificación de multiplexión del ADN (por ejemplo, el PCR 15 fluorescente específico del alelo). En algunas modalidades, la detección puede incluir la hibridación a una microadaptación (un chip, cuentas, etc.). En algunas modalidades, la detección puede incluir la elaboración de secuencias de las porciones apropiadas del gen que contienen los haplotipos buscados para 20 ser detectados. En algunas modalidades, los haplotipos que cambian la susceptibilidad de la digestión por una o más enzimas de restricción de endonucleasa pueden ser utilizados para la detección. Por ejemplo, puede ser utilizado el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP), el 25 cual se refiere al patrón de digestión cuando son aplicadas

varias enzimas de restricción al ADN. En algunas modalidades, la presencia de uno o más haplotipos puede ser determinada por medio de la amplificación específica del alelo. En algunas modalidades, la presencia de los haplotipos puede ser

5 determinada mediante la extensión del cebador. En algunas modalidades, la presencia de los haplotipos puede ser determinada mediante la ligación de oligonucleótidos. En algunas modalidades, la presencia de los haplotipos puede ser determinada mediante hibridación con una muestra etiquetada

10 de manera que se puede detectar. Ver, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2008/0153088 otorgada a Sun y asociados; Kobler y asociados, Identificación de un alelo 11T en el aparato de polipirimidina del intrón 8 del gen CFTR, *Genética en Medicina* 8(2): páginas

15 125 a 128 (2006); Costa y asociados, PCR de Multiplexión Fluorescente Específico del Alelo para la Haplotipificación del Lugar IVS8 (TG)m(T)n en el Gen CFTR, *Clin. Chem.*, 54: páginas 1564 a 1567 (2008); Johnson y asociados, Un Estudio Comparativo de Cinco Plataformas de Prueba Tecnológicamente

20 Diversas del CFTR, *J. Mol. Diagnostics*, 9(3) (2007); Pratt y asociados, Desarrollo de los Materiales de Referencia Genómicos para la Prueba de Genética de la Fibrosis Quística, *J. Mol. Diagnostics*, 11: páginas 186 a 193 (2009).

La amplificación de una secuencia de ácido nucleico

25 seleccionada, u objetivo puede ser llevada a cabo por

cualesquiera medios adecuados en el ADN aislado de las muestras biológicas. Ver generalmente, las publicaciones de D. Kwoh y T. Kwoh, 1990. Los ejemplos de las técnicas de amplificación adecuadas incluyen, pero no están limitadas a,

5 reacción de cadena de polimerasa, reacción de cadena de ligasa, amplificación de desplazamiento del hilo (ver generalmente, las publicaciones de Walker y asociados, 1992a; Walker y asociados, 1992b), amplificación basada en la transcripción (ver Kwoh y asociados, 1989), duplicación de

10 secuencia auto-sostenida (o "3SR") (ver Guatelli y asociados, 1990), el sistema de replicasa Q β (ver Lizardi y asociados, 1988), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (o "NASBA") (ver Lewis, 1992), la reacción de cadena de reparación (o "RCR") (ver Lewis, mencionada anteriormente), y

15 la amplificación de boomerang de ADN (o "BDA") (ver Lewis, mencionada anteriormente). Actualmente la preferida es la reacción de cadena de polimerasa.

Las técnicas de amplificación del ADN tales como las anteriores pueden comprender el uso de una muestra, un par de

20 muestras, o dos pares de muestras los cuales se enlazan específicamente al ADN que codifica el alelo ApoE 4, pero no se enlaza al ADN que codifica los alelos ApoE 2 o ApoE 3 bajo las mismas condiciones de hibridación, y el cual sirve como el cebador o cebadores para la amplificación del ADN del alelo

25 ApoE 4 o una reacción del mismo en la reacción de

amplificación. De un modo similar, se puede utilizar una muestra, un par de muestras, o dos pares de muestras los cuales se enlazan específicamente al ADN que codifica el alelo ApoE 2, pero no se enlazan al ADN que codifica los alelos ApoE 3 o ApoE 4 bajo las mismas condiciones de hibridación, y el cual sirve como el cebador o cebadores para la amplificación del ADN del alelo ApoE 2 o una porción del mismo en la reacción de amplificación; y se puede utilizar una muestra, un par de muestras, o dos pares de muestras los cuales se enlazan específicamente al ADN que codifica el alelo ApoE 3, pero no se enlaza al ADN que codifica los alelos ApoE 2 o ApoE 4 bajo las mismas condiciones de hibridación, y el cual sirve como un cebador o cebadores para la amplificación del ADN del alelo ApoE 3 o una porción del mismo en la reacción de amplificación.

De una manera similar, se puede utilizar una muestra, un par de muestras, o dos pares de muestras los cuales se enlazan específicamente al ADN que codifica el haplotipo de interés del gen TOMM40, pero no se enlaza a otros haplotipos del gen TOMM40 bajo las mismas condiciones de hibridación, y el cual sirve como el cebador o cebadores para la amplificación del ADN del gen TOMM40 o una porción del mismo en la reacción de amplificación.

En general, la muestra de oligonucleótido que es utilizada para detectar el ADN que codifica los haplotipos del alelo ApoE

y/o el gen TOMM40 es una muestra de oligonucleótido que se enlaza al ADN que codifica el haplotipo de interés, pero que no se enlaza al ADN que codifica otros haplotipos bajo las mismas condiciones de hibridación. La muestra de oligonucleótido es
5 etiquetada con un grupo que se puede detectar adecuado, tal como aquellos que se establecen más adelante en relación con los anticuerpos.

La reacción de cadena de polimerasa (PCR) se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas. Ver, por
10 ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; y 4,965,188. En general, el PCR comprende, primero, tratar una muestra de ácido nucleico (por ejemplo, en la presencia de una polimerasa de ADN estable en el calor) con un cebador de oligonucleótido por cada hilo de la
15 secuencia específica que va a ser detectada bajo las condiciones de hibridación de modo que un producto de la extensión de cada cebador sea sintetizado el cual es complementario a cada hilo de ácido nucleico, con los cebadores lo suficientemente complementarios para cada hilo
20 de la secuencia específica para hibridarla con el mismo de modo que el producto de extensión sintetizado de cada cebador, cuando es separado de su complemento puede servir como una plantilla para la síntesis del producto de extensión del otro cebador, y luego tratar la muestra bajo condiciones de
25 desnaturalización para separar los productos de extensión del

cebador de sus plantillas si la secuencia o secuencias que van a ser detectadas están presentes. Estos pasos son repetidos cíclicamente hasta que se obtiene el grado deseado de amplificación. La detección de la secuencia amplificada puede
5 llevarse a cabo agregando al producto de reacción una muestra de oligonucleótido que tiene la capacidad de hibridar en el producto de reacción (por ejemplo, una muestra de oligonucleótido de la presente invención), llevando la muestra una etiqueta que se puede detectar, y luego detectando la
10 etiqueta de acuerdo con técnicas conocidas, o mediante la visualización directa sobre un gel.

Cuando las condiciones del PCR permiten la amplificación de todos los tipos alélicos ApoE, los tipos pueden ser distinguidos por una hibridación con la muestra específica
15 alélica, mediante la digestión de la endonucleasa de restricción, mediante la electroforesis en los geles de gradiente de desnaturalización, u otras técnicas. Un protocolo PCR para determinar el genotipo del alelo ApoE lo describe Wenham y asociados (1991), incorporado como referencia a la presente
20 descripción. Los ejemplos de los cebadores específicos para la amplificación e identificación de las isoformas del alelo ApoE se describen en los mismos. Se pueden emplear los cebadores específicos para la región polimórfica del alelo ApoE (ya sea el alelo ApoE 4, E3 o E2). En Wenham, por ejemplo, los cebadores
25 PCR son empleados los cuales amplifican una región de 227 bp

del ADN que extiende los sitios polimórficos del alelo ApoE (los codones 112 y 158, los cuales contienen los nucleótidos 3745 y 3883). Los fragmentos amplificados entonces son sometidos a la endonucleasa de restricción CfoI la cual proporciona
5 diferentes fragmentos de restricción de los seis genotipos del alelo ApoE posibles los cuales se pueden reconocer en un gel de electroforesis. Ver también, las publicaciones de Hixon y asociados (1990); Houlston y asociados (1989) Wenham y asociados (1991); y Konrula y asociados (1990) para métodos
10 adicionales, todas las cuales están incorporadas a la presente descripción como referencia.

Además de la enfermedad de Alzheimer, existen varias otras enfermedades o padecimientos genéticamente complejos para los cuales los métodos de la presente invención
15 proporcionan ventajas sobre los análisis existentes. Por ejemplo, los datos de múltiples estudios genéticos de la diabetes melitus tipo 2 soportan el punto de vista de que necesariamente se proveerán casos/series de control clínico muy grande con significancia estadística para los lugares
20 definidos por los estudios de asociación a nivel genoma.

7. Agentes activos, composiciones y tratamiento.

Como se observó anteriormente, los árboles filogenéticos creados utilizando los métodos aquí detallados también pueden ser analizados basados en la capacidad de respuesta del
25 padecimiento de interés al tratamiento con un agente activo o el

método de tratamiento de interés de acuerdo con algunas modalidades, y las decisiones del tratamiento para un sujeto o paciente pueden estar basadas en las variantes genéticas específicas identificadas.

5 **Agentes activos.** Los agentes activos incluyen aquellos conocidos para el tratamiento de un padecimiento de interés, y son inclusivos de los agentes activos contra la enfermedad de Alzheimer, incluyendo, pero sin limitarse a, inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, y
10 agonistas o moduladores del receptor proliferador activado del peroxisoma (PPAR), incluyendo pero sin limitarse a esos fármacos en las clases de tiazolidindiona o glitazar. El agente activo también podría ser un producto biofarmacéutico, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonal,
15 policlonal, derivados de o modificados tales como Domain Antibodies™, Bapineuzumab, etc.), proteínas de fusión o moléculas terapéuticas de ARN. El agente activo podría también ser una combinación de cualquiera de estos productos.

Los ejemplos de los inhibidores de acetilcolinesterasa
20 incluyen, pero no están limitados a, donepezil (comercialmente disponible como ARICEPT), galantamina (comercialmente disponible como RAZADYNE), y rivastigmina (comercialmente disponible como EXELON) y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los ejemplos adicionales incluyen,
25 pero no están limitados a, los que se describen en las Patentes

Norteamericanas Nos. 6,303,633; 5,965,569; 5,595,883; 5,574,046; y 5,171,750 (las descripciones de todas las referencias de Patentes Norteamericanas aquí citadas están incorporadas en su totalidad a la presente descripción como
5 referencia).

Los ejemplos de los antagonistas del receptor de NMDA incluyen, pero no están limitados a, memantina (comercialmente disponible como AKATINOL, AXURA, EBIXIA/ABIXIA, MEMOX y NAMENDA) y las sales farmacéuticamente aceptables de los
10 mismos. Los ejemplos adicionales incluyen, pero no están limitados a, aquellos descritos en las Patentes Norteamericanas Nos. 6,956,055; 6,828,462; 6,642,267; 6,432,985; y 5,990,126.

Los ejemplos de las tiazolidindionas incluyen, pero no están limitados a, rosiglitazona (comercialmente disponible como AVANDIA) y las sales farmacéuticamente aceptables de la
15 misma. Los ejemplos adicionales incluyen, pero no están limitados a:

5-(4-[2-(N-metil-N-(2-benzotiazolil)amino)etoxi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

20 5-(4-[2-(N-metil-N-(2-benzotiazolil)amino)etoxi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-(2-benzoxazolil)amino)etoxi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

25 5-(4-[2-(N-metil-N-(2-benzoxazolil)amino)etoxi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-(2-pirimidinil)amino)etoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-(2-pirimidinil)amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5 5-(4-(2-(N-metil-N-[2-(4,5-dimetiltiazolil)]amino)etoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4,5-dimetiltiazolil)]amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

10 5-(4-[2-(N-metil-N-(2-tiazolil)amino)etoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-(2-tiazolil)amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-[4-(2-(N-metil-N-(2-(4-feniltiazolil))amino)etoksi]bencil]-2,4-tiazolidindiona;

15 5-(4-[2-(N-metil-N-(2-(4-feniltiazolil))amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4-fenil-5-metiltiazolil)]amino)etoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

20 5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4-fenil-5-metiltiazolil)]amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4-metil-5-feniltiazolil)]amino)etoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4-metil-5-feniltiazolil)]amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

25 5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4-metiltiazolil)]amino)etoksi]bencil)-

- 2,4-tiazolidindiona;
5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4-metiltiazolil)]amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;
5-[4-(2-(N-metil-N-[2-(5-feniloxazolil)]amino)etoksi)bencil]-
- 5 2,4-tiazolidindiona;
5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(5-feniloxazolil)]amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;
5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4,5-dimetiloxazolil)]amino)etoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;
- 10 5-(4-[2-(N-metil-N-[2-(4,5-dimetiloxazolil)]amino)etoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;
5-[4-(2-(2-pirimidinilamino)etoksi)bencil]-2,4-tiazolidindiona;
5-[4-(2-(2-pirimidinilamino)etoksi)benciliden]-2,4-
- 15 tiazolidindiona;
5-(4-[2-(N-acetil-N-(2-pirimidinil)amino)etoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;
5-(4-(2-(N-(2-benzotiazolil)-N-bencilamino)etoksi)benciliden)-2,4-tiazolidindiona;
- 20 5-(4-(2-(N-(2-benzotiazolil)-N-bencilamino)etoksi)bencil)-2,4-tiazolidindiona;
5-(4-[3-(N-metil-N-(2-benzoxazolil)amino)propoksi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;
5-(4-[3-(N-metil-N-(2-
- 25 benzoxazolil)amino)propoksi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-(2-piridil)amino)etoxi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-metil-N-(2-piridil)amino)etoxi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5 5-(4-[4-(N-metil-N-(2-benzoxazolil)amino)butoxi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[4-(N-metil-N-(2-benzoxazolil)amino)butoxi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

10 5-(4-[2-(N-(2-benzoxazolil)amino)etoxi]benciliden)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-(2-benzoxazolil)amino)etoxi]bencil)-2,4-tiazolidindiona;

5-(4-[2-(N-isopropil-N-(2-benzoxazolil)amino)etoxi]bencil)-2,4-tiazolidindiona, y

15 las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 5,002,953.

Los agentes activos aquí descritos pueden, como se observó anteriormente, ser preparados en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente
20 aceptables son sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto de origen y no imparten efectos toxicológicos indeseables. Los ejemplos de dichas sales son (a) sales de adición ácida formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico,
25 ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; y las sales formadas

con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; (b) las sales formadas de aniones elementales tales como cloro, bromo, y yodo, y (c) las sales derivadas de las bases, tales como sales de amonio, sales de metal alcalino tales como aquellas sales de sodio y potasio, sales de tierra alcalina tales como aquellas sales de calcio y magnesio, y sales con bases orgánicas tales como diciclohexilamina y N-metil-D-glucamina.

Los agentes activos pueden ser administrados en la forma de profármacos. "Profármacos" como se usan en la presente descripción se refieren a aquellos profármacos de los compuestos de la presente invención los cuales son, dentro del alcance de la opinión médica razonable, adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de los humanos y animales inferiores sin una toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, que se pueden medir con una proporción de riesgo/beneficio razonable, y efectivos para su uso pretendido así como las formas zwitteriónicas, en donde es posible, de los compuestos de la invención. El término "profármaco" se refiere a los compuestos que son

transformados rápidamente *in vivo* para producir el compuesto de origen de las fórmulas anteriores, por ejemplo, mediante la hidrólisis en la sangre. Una explicación completa se proporciona en el libro de T. Higuchi y V. Stella, Profármacos
5 como Sistemas de Administración Novedosos, Vol. 14 de la Serie del Simposio A.C.S. y en el libro de Edward B. Roche, ed., Vehículos Biorreversibles en el Diseño de Fármacos, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987, ambos de los cuales están incorporados como referencia a la
10 presente descripción. También ver la Patente Norteamericana No. 6,680,299. Los ejemplos incluyen un profármaco que es metabolizado *in vivo* por un sujeto a un fármaco activo que tiene una actividad de los compuestos activos como aquí se describen, en donde el profármaco es un éster de un alcohol o
15 grupo de ácido carboxílico, si dicho grupo está presente en el compuesto; un acetal o ketal de un grupo de alcohol, si dicho grupo está presente en el compuesto; una base N-Mannich o una imina del grupo amina, si dicho grupo está presente en el compuesto; o una base de Schiff, oxima, acetal, enol éster,
20 oxazolidina, o tiazolidina de un grupo carbonilo, si dicho grupo está presente en el compuesto, tal como se describen en la Patente Norteamericana No. 6,680,324 y la Patente Norteamericana No. 6,680,322.

Composiciones. Los agentes activos descritos
25 anteriormente pueden ser formulados para la administración en

un vehículo farmacéutico de acuerdo con las técnicas conocidas. Ver, por ejemplo, "La Ciencia y Práctica de la Farmacia" de Remington (Remington, *The Science And Practice of Pharmacy*) (9ª Ed. 1995). En la manufactura de una

5 formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, el compuesto activo (incluyendo las sales fisiológicamente aceptables del mismo) es mezclado generalmente con, entre otros, un vehículo aceptable. El vehículo debe, por supuesto, ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquiera de

10 los otros ingredientes en la formulación y no debe de ser perjudicial para el paciente. El vehículo puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y preferentemente es formulado con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta, la cual puede contener del 0.01% o del 0.5% al

15 95% o del 99% en peso del compuesto activo. Uno o más compuestos activos pueden ser incorporados en las formulaciones de la invención, los cuales pueden ser preparados mediante cualquiera de las técnicas bien conocidas de farmacia que comprenden la mezcla de los componentes,

20 opcionalmente incluyendo uno o más ingredientes accesorios.

Las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica, bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, o

25 intravenosa), tópica (por ejemplo, para ambas las superficies de

la piel y la mucosa, incluyendo las superficies de las vías aéreas) y transdérmica, aunque la ruta más adecuada en cualquier caso determinado dependerá de la naturaleza y severidad del padecimiento que está siendo tratado y de la naturaleza del compuesto activo particular el cual está siendo
5 utilizado.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden ser presentadas en unidades separadas, tales como cápsulas, pastillas, o tabletas, conteniendo cada una una
10 cantidad previamente determinada del compuesto activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. Dichas formulaciones pueden ser preparadas mediante cualesquiera métodos de farmacia
15 adecuados los cuales incluyen los pasos de poner en asociación el compuesto activo y un vehículo adecuado (el cual puede contener uno o más ingredientes accesorios como se indicó anteriormente). En general, las formulaciones de la presente invención son preparadas mezclando de manera uniforme e
20 íntima el compuesto activo con un líquido o un vehículo sólido dividido finamente, o ambos, y luego, si es necesario, darle forma a la mezcla resultante. Por ejemplo, una tableta puede ser preparada comprimiendo o moldeando un polvo o gránulos que contienen el compuesto activo, opcionalmente con uno o
25 más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas pueden

ser preparadas comprimiendo, en una máquina adecuada, el compuesto en una forma que fluye de manera libre, tal como un polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un enlazador, lubricante, diluyente inerte, y/o agentes de dispersión/activos de superficie. Las tabletas moldeadas se pueden hacer
5 moldeando, en una máquina adecuada, el compuesto pulverizado humedecido con un enlazador líquido inerte.

Las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen píldoras que comprenden el compuesto
10 activo en una base saborizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que comprenden el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración parenteral comprenden soluciones de
15 inyección acuosas y no acuosas estériles de los compuestos activos, cuyas preparaciones preferentemente son isotónicas con la sangre del recipiente pretendido. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostatos y solubles los cuales hacen que la formulación sea isotónica con
20 la sangre del receptor pretendido. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden ser presentadas en dosis unitarias o en contenedores de dosis múltiples, por ejemplo, ampollitas y frascos sellados, y pueden ser
25 almacenadas en una condición secadas por congelación

(liofilizadas) requiriendo solamente la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes de utilizarse. Las soluciones de inyección extemporánea y suspensiones pueden ser preparadas

5 a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo anteriormente descrito. Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición estéril, estable que se puede inyectar y que comprende un agente(s) activo(s), o una sal del mismo, en una forma de dosificación

10 unitaria en un contenedor sellado. El compuesto o sal se proporciona en la forma de un liofilizado el cual tiene la capacidad de ser reconstituido con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una composición líquida adecuada para la inyección del mismo en

15 un sujeto. La forma de dosis unitaria comprende generalmente de aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 10 gramos del compuesto o sal. Cuando el compuesto o sal es substancialmente insoluble en agua, una cantidad suficiente de agente de emulsificación la cual es fisiológicamente aceptable

20 puede ser empleada en una cantidad suficiente para emulsificar el compuesto o sal en un vehículo acuoso. Uno de dichos agentes de emulsificación útiles es la fosfatidilcolina.

Las formulaciones adecuadas para la aplicación tópica a la piel preferentemente toman la forma de un ungüento, crema,

25 loción, pasta, gel, rocío, aerosol, o aceite. Los vehículos los

cuales pueden ser utilizados incluyen vaselina, lanolina polietilén-glicoles, alcoholes, mejoradores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de los mismos.

Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica pueden ser presentadas como parches separados adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor por un período de tiempo prolongado. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también pueden ser administradas mediante iontoforesis (ver, por ejemplo, *Pharmaceutical Research* 3 (6): página 318 (1986)) y generalmente toman la forma de una solución acuosa regulada opcionalmente del compuesto activo. Las formulaciones adecuadas comprenden regulador de citrato o bis/tris (pH 6) o etanol/agua y contienen el ingrediente activo de 0.1 M a 0.2 M.

Además de los compuestos activos, las composiciones farmacéuticas pueden contener otros aditivos, tales como aditivos ajustadores de pH. En particular, los agentes ajustadores de pH útiles incluyen ácidos, tales como ácido clorhídrico, bases o reguladores, tales como lactato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio, o gluconato de sodio. Además, las composiciones pueden contener conservadores microbiales. Los conservadores microbiales útiles incluyen metilparabeno, propilparabeno, y alcohol bencílico. El conservador microbial generalmente es empleado cuando la formulación es colocada en un frasco

diseñado para las dosis múltiples. Por supuesto, como se indicó, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser liofilizadas utilizando técnicas bien conocidas en el arte.

5 **Dosificación.** Las dosificaciones terapéuticamente efectivas de cualquier agente activo específico, cuyo uso se encuentra en el alcance de la presente invención, variará algo de compuesto a compuesto, y de paciente a paciente, y dependerá de las condiciones del paciente y la ruta de
10 administración. Para administración oral, la dosificación diaria total de 1, 2 ó 3 mg, hasta de 30, 40 ó 50 mg, puede ser utilizada, administrada como una sola dosis diaria o dividida en dos o tres dosis diarias.

15 **Tratamiento.** Las variantes genéticas que aquí se describen o que aquí se descubrieron utilizando los métodos aquí enseñados pueden ser utilizadas para determinar el curso del tratamiento de un paciente afligido con un padecimiento (por ejemplo, un padecimiento asociado con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40), mediante, por ejemplo, la determinación de que
20 el agente activo y/o el curso del tratamiento a administrar basado en la presencia o ausencia de la variante o variantes genéticas. La presencia o ausencia de las variantes genéticas puede indicar la eficacia de un agente activo y/o el curso del tratamiento para el paciente, pronosticar la edad de
25 presentación para un padecimiento, indicar los regímenes de

dosis preferidos, etc. Un perfil genético puede ser generado para un paciente, y el perfil consultado para determinar si el paciente se encuentra entre un grupo de pacientes que probablemente actuarán en respuesta a un agente activo particular.

Las instrucciones de uso pueden ser empacadas con o asociadas de otra manera con un agente activo indicando las recomendaciones para el tratamiento, tiempo del tratamiento, regímenes de dosis, etc., basados en la presencia o ausencia de las variantes genéticas.

8. Métodos para determinar una predicción de un riesgo de enfermedad o pronóstico.

Para determinar una predicción del riesgo de enfermedad para un individuo no sintomático o un pronóstico (el prospecto de aflicción o el curso de la enfermedad anticipado del curso de enfermedad usual o peculiaridades del caso) de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, los datos de diagnóstico, incluyendo la diagnosis del paciente o la historia médica y los datos genéticos, tales como el genotipo del paciente (por ejemplo, genotipo ApoE y/o TOMM40), pueden ser procesados para proporcionar opciones terapéuticas y predicciones de resultados. El procesamiento puede incluir la obtención de un "perfil del paciente" tal como la recolección de la historia médica del paciente incluyendo la edad y género, la genotipificación de los lugares de interés (por ejemplo,

utilizando cebadores diseñados apropiadamente y utilizando una amplificación RT-PCR o PCR y/o la fenotipificación, por ejemplo, utilizando un método portado por un anticuerpo o una prueba enzimática), y el análisis estadístico o de otra naturaleza que convierte estos datos simples en un pronóstico. El pronóstico puede incluir una predicción de una edad del paciente de presentación de la enfermedad, respuesta a la terapia del fármaco, tiempo para el tratamiento, eficacia del tratamiento, etc. En algunas modalidades, el pronóstico puede incluir el uso de un programa de software de computadora para analizar los datos del paciente y operar revisiones cruzadas estadísticas contra las bases de datos de relación con el objeto de convertir los datos o perfil del paciente en un pronóstico.

Un "perfil del paciente" incluye los datos y/o materiales que pertenecen al paciente del cual está siendo realizado el análisis predictivo y/o el pronóstico. Los datos pueden incluir información sobre la diagnosis del paciente, edad, género, y/o genotipo. El perfil del paciente también puede incluir materiales del paciente tales como sangre, muestras de proteína del suero, líquido cerebroespinal, o ARN o ADN purificado.

9. Estratificación del genotipo en los ensayos clínicos.

La detección a un genotipo aquí enseñada o como es determinada con los métodos de la presente descripción puede ser utilizada para realizar el ensayo clínico de una manera similar a que otra información del genotipo es utilizada para

conducir un ensayo clínico, tal como los que se describen en, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 6,573,049 6,368,797 y 6,291,175.

En algunas modalidades, dichos métodos estratifican de
5 manera ventajosa o permiten la refinación de la población de
pacientes (por ejemplo, mediante la división de la población en
uno o más subgrupos) de modo que las ventajas de los
regímenes del tratamiento particulares pueden ser detectadas
de una manera más exacta, particularmente con respecto a las
10 sub-poblaciones particulares de pacientes con los genotipos
particulares. En algunas modalidades, dichos métodos
comprenden la administración de un agente activo de prueba o
terapia a una pluralidad de sujetos (una terapia de control o
placebo generalmente siendo administrada a una pluralidad de
15 sujetos separada, pero caracterizada de una manera similar) y
detectar la presencia o ausencia de un genotipo (por ejemplo,
ApoE y/o TOMM40) como se describió anteriormente en la
pluralidad de sujetos. El genotipo puede ser detectado antes,
después, o concurrentemente con el paso de administración de
20 la terapia de prueba. La influencia de uno o más alelos
detectados en la terapia de prueba puede entonces ser
determinada en cualquier parámetro adecuado o resultado o
consecuencia del tratamiento potencial, incluyendo, pero sin
limitarse a, la eficacia de dicha terapia, la falta de efectos
25 secundarios de la terapia, etc.

Un ensayo clínico puede ser preparado para probar la eficacia de los compuestos de prueba para tratar cualquier número de enfermedades para las cuales ha sido determinado un genotipo particular para ser asociado, para sujetos los
5 cuales son diagnosticados con la enfermedad o se encuentran en riesgo del desarrollo de la enfermedad. Si los sujetos son genotipificados después de terminar un ensayo clínico, los análisis pueden entonces ser utilizados para determinar una relación entre un tratamiento para una enfermedad y el alelo
10 que va a ser evaluado por su eficacia. Alternativamente, si un sujeto sintomático o asintomático todavía no ha sido diagnosticado con la enfermedad pero ha sido determinado como que se encuentra en riesgo de desarrollar la enfermedad, un ensayo clínico similar al ensayo clínico descrito
15 anteriormente se puede llevar a cabo.

Los mecanismos biológicos subyacentes pueden también ser considerados cuando se diseña en los grupos del tratamiento. Por ejemplo, el fragmento del alelo ApoE 4 (1-272) se enlaza a la mitocondria, disminuye la dinámica celular de la
20 mitocondria y disminuye la sinaptogénesis más que el alelo ApoE 3 (1-272). La rosiglitazona, un fármaco candidato para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, aumenta la mitogénesis y aumenta la sinaptogénesis – opuesta a los efectos del enlace del fragmento del alelo ApoE – para los
25 alelos ApoE 3 mayores que con los alelos ApoE 4. Por lo tanto,

el fármaco o candidato de tratamiento (por ejemplo, rosiglitazona) pueden ser seleccionados basados en el mecanismo subyacente de acción conforme se relaciona con los marcadores genéticos utilizados para las estratificaciones (por ejemplo, las variantes de alelos ApoE 2, E 3, E 4 y/o gen TOMM40).

La evaluación de la eficacia de un fármaco seleccionado para el ensayo puede incluir el monitoreo del sujeto por un período de tiempo y el análisis de la demora de presentación de la enfermedad y la intensidad de la enfermedad al momento de la presentación, así como medir la presentación de los síntomas los cuales están asociados con la enfermedad. Un fármaco que, en un ensayo clínico, elimina o demora la presentación de la enfermedad, o reduce los síntomas de la enfermedad puede ser un fármaco benéfico para utilizarse en pacientes diagnosticados con la enfermedad o que se encuentran en riesgo de desarrollar la enfermedad. Los compuestos de prueba que pueden ser utilizados en dichos ensayos incluyen los agentes que se describieron anteriormente, incluyendo aquellos anteriormente aprobados para el uso clínico y compuestos nuevos que todavía no han sido aprobados para el uso, o tomados para el tratamiento de una enfermedad particular. Por lo tanto, en algunas modalidades, el ensayo clínico puede incluir la optimización de la administración del fármaco, incluyendo la dosificación, temporización de administración, toxicidades o

efectos colaterales, la ruta de administración, y la eficacia del tratamiento.

10. Equipos útiles para la detección de las variantes del genotipo en los lugares de interés.

5 Se proporcionan en esta descripción, los equipos para determinar si un sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad, desarrollando una enfermedad en una edad de presentación más temprana, y/o un candidato para un tratamiento particular, en donde la enfermedad está asociada con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40 (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía). Estos equipos incluyen por lo menos un reactivo específico para detectar la presencia o ausencia del alelo ApoE y/o la variante del gen TOMM40 como aquí se describe, y puede incluir 10 instrucciones para ayudar a determinar si el sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad. El equipo puede incluir opcionalmente un ácido nucleico para la detección de un gen ApoE (por ejemplo, ApoE 2, ApoE 3 y/o ApoE 4) o instrucciones para métodos de enfoque isoeléctrico para 15 detectar el genotipo ApoE; y/o un ácido nucleico para la detección de una variante del gen TOMM40 como aquí se describen. En algunas modalidades, el equipo puede incluir opcionalmente uno o más anticuerpos los cuales se enlazan a los alelos ApoE 2, ApoE 3, ApoE 4, o a las isoformas del gen 20 TOMM40. El equipo de prueba puede ser empacado de cualquier 25

manera adecuada, generalmente con todos los elementos en un solo contenedor junto con una hoja de instrucciones impresas para llevar a cabo la prueba.

En algunas modalidades, el equipo puede contener
5 opcionalmente reguladores, enzimas, y reactivos para amplificar los ácidos nucleicos genómicos por medio de la amplificación dirigida por el cebador. El equipo también puede incluir uno o más aparatos para detectar la presencia o ausencia de haplotipos particulares en el ácido nucleico amplificado. Dichos
10 aparatos pueden incluir una o más muestras que hibridan a un ácido nucleico del haplotipo, el cual puede estar enlazado a un bio-chip o un aparato de microadaptación, tal como cualquiera de aquellos que se describen en la Patente Norteamericana No. 6,355,429. El bio-chip o aparato de microadaptación
15 opcionalmente tiene por lo menos una muestra de captura enlazada a una superficie que puede hibridar a una secuencia del haplotipo. En las modalidades preferidas, el bio-chip o el microadaptador contienen muestras múltiples, y lo más preferente es que contiene por lo menos una muestra para una
20 secuencia de haplotipos en donde, si están presentes, serían amplificados por un conjunto de cebadores de flanqueo. Por ejemplo, si son utilizados cinco pares de cebadores de flanqueo para las amplificaciones, el aparato contendría por lo menos una muestra de haplotipo para cada uno de los productos
25 amplificados, o por lo menos cinco muestras. El equipo también

preferentemente incluye instrucciones para utilizar los componentes del mismo.

La presente invención es explicada con mayor detalle en los siguientes Ejemplos no limitativos.

5 **EJEMPLO 1: Construcción de Árboles Filogenéticos**

Todos los estudios de exploración a nivel genómico conocidos demuestran valores *p* extremadamente significativos alrededor del lugar de la apolipoproteína C1 [ApoC1]. (Mahley y asociados, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 103: páginas 5644 a 5651
10 (2006), Coon y asociados, J. Clin. Psychiatry 68: páginas 613 a 618 (2007); Li y asociados, Arch. Neurol. 65: páginas 45 a 53 (2007)). De igual importancia es que cada serie identificada como un gen candidato de línea del límite "favorecido" fuera del área de desequilibrio de enlace del alelo ApoE, pero estos
15 genes candidatos favorecidos fueron diferentes en cada estudio. El gen TOMM40 está cerca del alelo ApoC1 y en un desequilibrio de enlace con el alelo ApoE. Las interacciones entre los alelos ApoE 3 o ApoE 4 y las diferentes isoformas del gen TOMM40 se considera que están asociados con el riesgo
20 aumentado o disminuido de desarrollar la enfermedad de Alzheimer dentro de un rango de edad más temprana. Las curvas de la edad de presentación para los genotipos del alelo Apo 4/4, 3/4, 3/3, 2/4, y 2/3 se muestran en la figura 2, indicando un rango de riesgo para el desarrollo más temprano
25 de la enfermedad, dependiendo del perfil del alelo ApoE. Sin

embargo, el alelo ApoE solo no parece explicar todos los datos en estas curvas de la edad de presentación.

Diferentes métodos para la elaboración del perfil polimórfico del riesgo de la enfermedad de Alzheimer asociado con los diferentes alelos ApoE han sido propuestos (ver, por ejemplo, la Solicitud de Patente Norteamericana de Cox y asociados, No. 20060228728; la Solicitud de Patente Norteamericana de Li y Grupe, No. 20080051318). Aquí se demuestra un método filogenético para un misterio del alelo ApoE 4.

Muestras biológicas, aislamiento de ADN, amplificación de los lugares de interés. Un total de 340 sujetos incluidos en 135 casos de la enfermedad de Alzheimer y con edades de 99 años cotejadas en los Grupos de control A así como 57 casos y 49 controles en el Grupo B. Todos los sujetos son portadores de los genotipos del alelo ApoE anteriormente asociados con el riesgo más alto de una presentación de la enfermedad más temprana (por ejemplo, 3/3, 3/4, ó 4/4). Las muestras biológicas que contienen el ADN fueron recolectadas de todos los sujetos. El ADN genómico fue entonces aislado de acuerdo con métodos convencionales para la elaboración de secuencias de los lugares genéticos en el Cromosoma 19.

La figura 3 muestra las regiones genéticas que tienen como objetivo para el estudio el Cromosoma 19 utilizando los datos de exploración a nivel del genoma de los reportes

múltiples. La región está comprendida dentro de la secuencia de referencia del GenBank AF050154. El software fue utilizado para generar alineaciones múltiples de la secuencia para lugares variantes (por ejemplo, ClustalW2, European Bioinformatics Institute). Posteriormente, las alineaciones múltiples de la secuencia fueron analizadas utilizando el software para desarrollar los árboles filogenéticos (por ejemplo, la versión MEGA 2.1, Centro para la Evolución del Genoma Funcional, TREEVOLVE, Departamento de Zoología, Universidad de Oxford, o el software de construcción basado en la parsimonia tal como PAUP, Sinauer Associates). El análisis estadístico puede ser realizado con, por ejemplo, Análisis de Datos Genéticos (GDA: El Software para el Análisis de Datos Separados, del Centro de Investigación de Bioinformática de la Universidad Estatal de North Carolina). Los resultados del análisis de la Región B se demuestran en el árbol filogenético de la figura 4.

Cada pieza de datos de la figura 4 representa una variante observada de la secuencia. Estas variantes pueden ser sustituciones, inserciones, eliminaciones de nucleótidos, o microsatélites y pueden o no dar como resultado diferencias que se pueden detectar en la expresión del gen o función de la proteína. Cada nodo representa una variante (o un número de variantes) que ocurre en más de un cromosoma. Los nodos adyacentes definen los límites de las secuencias que están en

cis, y por lo tanto más probablemente serán heredadas como una unidad, en la región de interés en un cromosoma del sujeto. Los nodos que preceden el número mayor de nodos subsecuentes representan variantes ancestrales de evolución de los cuales ha ocurrido con el paso del tiempo la divergencia genética.

La presencia de los haplotipos o variantes de la secuencia correspondientes con las regiones del árbol que representa sujetos con una incidencia substancialmente más alta de la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, proporciones más altas de sujetos afectados con la enfermedad a sujetos de control no afectados) significaría que el sujeto individual también está en un riesgo aumentado. Por el contrario, las proporciones substancialmente más bajas corresponden al riesgo reducido de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

El gen TOMM40 interactúa con el alelo ApoE directamente en la regulación de la importación de proteína de la mitocondria, y la hipótesis actual es que la expresión de una variante particular del gen TOMM40 exacerba el riesgo relativamente moderado para la enfermedad de Alzheimer asociado con una presencia dependiente de la dosis del alelo ApoE 3. Dicha variante del gen TOMM40 se ha descubierto dentro de la Región B utilizando los métodos de la presente invención.

La prueba de nuevos fármacos en sujetos humanos lleva

un riesgo inmenso (ver Kenter y Cohen, Lancet, 368: páginas 1387 a 1391 (2006)). El uso de los árboles filogenéticos para anticipar la respuesta individual a un fármaco o tratamiento de interés tiene el potencial de aliviar ese riesgo de manera importante. Los estudios preliminares indicaron que la rosiglitazona (Avandia) puede tener una eficacia específica del perfil genético en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (ver Risner y asociados, The Pharmacogenomics Journal 6, páginas 246 a 254 (2006); Brodbeck y asociados, Proc. Nat. Acad. Sci. 105, páginas 1343 a 1346 (2008)). Los datos del ensayo clínico de la fase II indican que los pacientes de la enfermedad de Alzheimer sin un alelo ApoE 4 respondieron mejor a la rosiglitazona que los pacientes que portaban cualquiera de 1 ó 2 alelos ApoE 4 (datos no mostrados). Esto soporta la hipótesis de que las variantes identificadas con los métodos aquí enseñados pueden ser utilizadas para controlar la respuesta individual al tratamiento basado en el genotipo.

EJEMPLO 2: Identificación de las Variantes de Interés del Gen TOMM40

174 secuencias (2 de cada uno de los 87 sujetos) fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X (versión 2.0.10, Larkin y asociados, Clustal W y Clustal X versión 2.0. Bioinformatics, 23: páginas 2947 a 2948 (2007)). La alineación múltiple de las secuencias fue utilizada para construir un árbol filogenético utilizando un algoritmo de unión de los vecinos

(Saitou y Nei. El método de unión de los vecinos: un nuevo método para la reconstrucción de los árboles filogenéticos. Mol. Evol. Biol., 4: páginas 406 a 425 (1987)) implementado en el sitio web del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI).

5 El árbol filogenético resultante tiene una estructura de dos grupos principales (A, B) en la primera divergencia. Las frecuencias del genotipo ApoE para estos grupos son tabulados y se muestran en la figura 5. Es claro que el grupo B contiene haplotipos de sujetos principalmente de los genotipos del alelo
10 ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$ y $\epsilon 3/\epsilon 4$ y casi ninguno de $\epsilon 4/\epsilon 4$. El grupo A contiene casi todos los haplotipos de los sujetos con el genotipo del alelo $\epsilon 4/\epsilon 4$.

La lista de los polimorfismos generados en la plataforma de descubrimiento SNP (Polimórfica) fueron utilizados para
15 identificar las variantes específicas en el gen TOMM40 que separaron los datos en dos grupos. Una prueba de proporción de probabilidad fue utilizada para identificar las variantes importantes con un valor p menor de 0.005.

La lista de variantes se resume en la Tabla 1. En la tabla,
20 el término "eliminación" es utilizado cuando el alelo menor es una eliminación de un nucleótido, y el término "inserción" es utilizado cuando el alelo menor es añadido de un nucleótido. El término "polimorfismo de eliminación/inserción" es utilizado cuando existen más de dos formas posibles y el alelo menor no
25 se puede apreciar. Por ejemplo, para los polimorfismos poli-T,

existen polimorfismos observados de longitudes múltiples. La segunda columna de la tabla proporciona información sobre las identidades de los alelos específicos asociados con la variante que divide las secuencias en dos grupos. Por ejemplo, T>A indica que el alelo T segrega secuencias dentro del grupo "A" en el árbol filogenético. Cuando se encuentran en la lista dos alelos, por ejemplo, G>B; A>A, cada alelo separa de manera única los datos de la secuencia en dos grupos, mientras que cuando se encuentra en la lista un solo alelo éste está asociado con la separación predominante de los datos, y el alelo restante no separa de manera exclusiva los datos en un grupo homogéneo, sino en vez de ello una mezcla de ambos grupos.

15

20

25

Tabla 1. Variantes del gen TOMM40 asociadas con los grupos del árbol filogenético que se distribuyen de acuerdo con el genotipo ApoE.

5		Variante	Grupo alelo>árbol	Ubicación Genómica (Construcción 36.3 del NCBI)	Función	Clasificación UCSC
		50,092,565	T>A	50,092,565	Intrón 6	solo
		50,092,587	T>A	50,092,587	Intrón 6	solo
		rs8106922	G>B; A>A	50,093,506	Intrón 6	solo
		rs34896370, rs55821237, rs56290633	T12_C_T15, T12_C_T16, T13_C_T14, T13_C_T15, T13_C_T16>A; T14_C_T14, T14_C_T15>B	50,093,609	Intrón 6	complejo
10		rs34878901	T>B; C>A	50,094,317	Intrón 6	solo
		rs35568738	C>B	50,094,558	Intrón 6	solo
		rs10602329	T16,17,18>A T14,15>B	50,094,716	Intrón 6	inserción/eliminación
		50,094,733	->A	50,094,733	Intrón 7	inserción
		rs10524523	T12,14,15,16,17>B T21,22,26,27,28,29, 30,31,32,33,34 35,36>A	50,094,889	Intrón 6	inserción/eliminación
15		rs1160985	T>B; C>A	50,095,252	Intrón 6	solo
		50,095,506	T>A	50,095,506	Intrón 6	solo
		rs760136	A>A; G>B	50,095,698	Intrón 6	solo
		rs1160984	T>B	50,095,764	Intrón 6	solo
		rs741780	C>B; T>A	50,096,271	Intrón 8	solo
		rs405697	A>A	50,096,531	Intrón 9	solo
		50,096,647 (DIP3)	->A	50,096,647	Intrón 9	eliminación
		50,096,697	C>A	50,096,697	Intrón 9	solo
20		rs1038025	C>B; T>A	50,096,812	Intrón 9	solo
		rs1038026	G>B; A>A	50,096,902	Intrón 9	solo
		rs1305062	C>B; G>A	50,097,361	Intrón 9	solo
		rs34215622	G>B; ->A	50,098,378	Exón 10	inserción
		rs10119	A>A	50,098,513	Exón 10	solo
		rs7259620	G>A; A>B	50,099,628	desconocida	solo

EJEMPLO 3: Dos formas diferentes del alelo ApoE 3: aquellas enlazadas a los haplotipos del gen TOMM40 que

**aumentan el riesgo y disminuyen la edad de presentación, y
aquellos que disminuyen el riesgo**

Los genotipos de asociación de apolipoproteína E (ApoE), particularmente ApoE ϵ 4 (ApoE 4), con el riesgo y edad de presentación de la enfermedad de Alzheimer (AD) sigue siendo la asociación genética más confirmada de cualquier enfermedad compleja. Los estimados de la capacidad para heredar el alelo ApoE 4 para la presentación tardía de AD se encuentran en un rango del 58% al 79%, y el riesgo que se puede atribuir a la población debido al alelo ApoE 4 se encuentra dentro del 20% y 70%. Estos estimados sugieren que otras variantes genéticas y/o interacciones entre las variantes incurren en riesgos de enfermedad adicionales y modifican la distribución de la edad de presentación.

La asociación de exploración a nivel del genoma resultante para la AD se ha reproducido de manera consistente la asociación extraordinaria de la región LD que contiene el alelo ApoE. El gen TOMM40, la translocasa de proteína de la membrana exterior de la mitocondria, se encuentra en un LD alto con el alelo ApoE, y codifica el canal de la membrana a través de la cual los péptidos y proteínas citoplásmicas atraviesan con el objeto de sintetizar nueva mitocondria. Nuestros objetivos fueron identificar los haplotipos adicionales dentro de la región LD que aumentan los estimados de capacidad de herencia.

Métodos: Examinamos la región LD que contiene ambos el alelo ApoE y el gen TOMM40 utilizando la elaboración de secuencias primarias profundas (10X) en pacientes de la AD y los controles. Realizamos los análisis filogenéticos de la región LD cubriendo el gen TOMM40 y el alelo ApoE en 66 pacientes y controles cotejados de edad de 66 años con respecto al riesgo y distribución de edad de presentación.

Conclusión: Descubrimos que las familias heredaron diferentes y únicas variantes del gen TOMM40 diferentes que están localizados en el mismo intervalo genómico que el alelo ApoE 3, pero no en el intervalo genómico que contiene el alelo ApoE 4, y puede ya sea aumentar o disminuir la distribución de edad de riesgo de la AD. Por lo tanto, la herencia genética de estas variantes del gen TOMM40 son independientes de la herencia del alelo ApoE 4, proporcionando efectivamente una diferenciación de dos formas diferentes del alelo ApoE 3: aquellos enlazados a los haplotipos del gen TOMM40 que aumentan el riesgo y disminuyen la edad de presentación, y aquellos que disminuyen el riesgo. Estos datos aumentan la exactitud del riesgo de edad de presentación genético, dependiendo de la edad. El alelo ApoE y los genotipos del gen TOMM40 proporcionan la oportunidad de definir el alto riesgo de la AD por los siguientes 5 a 7 años, contra el riesgo más bajo de la AD.

**EJEMPLO 4: Análisis de tres variantes de DIP del gen
TOMM40 identificadas**

Tres de las variantes del gen TOMM40 identificadas en esta solicitud son polimorfismos de eliminación/inserción (DIP) localizadas en el intrón 6 o el intrón 9. Estos DIP son identificados como rs10524523 y rs10602329 en el Centro Nacional para la Información de Biotecnología de la base de datos dbSNP, y un polimorfismo no descrito anteriormente, designado como DIP3. Estos polimorfismos están localizados en chr19:50,094,889, chr19:50,094,731, y chr19:50,096,647, respectivamente, de acuerdo con la construcción 36 del NCBI. La presente invención describe la identificación de estos DIP utilizando el análisis filogenético del gen TOMM40, específicamente de un fragmento de 10 Kb del gen, y que los DIP están asociados con diferentes grupos de evolución determinados por el análisis filogenético. Esta intervención describe además la utilidad de estos DIP para (1) determinar el riesgo de una persona sana de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en el futuro, y (2) pronosticar la edad de presentación de la AD dentro de aproximadamente un cuadro de tiempo de 8 años.

Los tres polimorfismos DIP aquí caracterizados corresponden a longitudes diferentes de las repeticiones poli-T del DIP en el gen TOMM40. La asociación de DIP de las variantes poli-T y el riesgo de la enfermedad tienen

precedencia. Por ejemplo una variante poli-T en el intrón 8 de la transmembrana de fibrosis quística en el gen regulador de conductancia (CFTR) está asociado con el salto del exón 9 y el desarrollo de la fibrosis quística (Groman y asociados, Am J Hum Genet 74(1): páginas 176 a 179 (2004)). En la presente descripción se describe: (1) el uso de un análisis novedoso de la asociación del método-filogenético (descrito anteriormente) para identificar los DIP que predicen el riesgo de enfermedad y/o las diferencias en la edad de presentación de la enfermedad, (2) la identidad de tres DIPs específicos asociados con las diferencias de edad de la presentación de la AD y el riesgo de la AD, (3) el uso de estos SNP individualmente, junto, o con otras secuencias variantes en el gen TOMM40 o el alelo ApoE para diagnosticar la enfermedad o pronosticar o determinar las características de la enfermedad tales como edad de presentación de la enfermedad, pronóstico de la enfermedad, sub-tipos de la enfermedad, severidad de la enfermedad, y también analizar o determinar la respuesta a los fármacos.

El análisis filogenético revela la distribución de los DIPs rs10524523 y rs10602329 dentro de dos categorías diferentes. Este análisis revela las longitudes más cortas de poli-T en el mapa de estos lugares para las categorías identificadas filogenéticamente en el grupo B, el grupo que también comprende los porcentajes más altos de sujetos del genotipo

ApoE e3/e3, efectivamente pocos sujetos (0%) del fenotipo ApoE e4/e4 y proporciones de control/caso inferiores (por ejemplo, el riesgo de la enfermedad de AD) (figura 5). La asociación entre la longitud del DIP y el grupo filogenético es estadísticamente importante ($p < 0.0001$) debido a la prueba de proporción de probabilidad o la prueba Chi-square de Pearson.

Debido a la arquitectura genómica, el desequilibrio alto de enlace y las relaciones de evolución indicadas en el análisis filogenético, entre los dos genes, y la interacción física putativa entre dos productos del gen, la influencia del genotipo del gen TOMM40 probablemente se extiende a otras enfermedades que son influenciadas por el genotipo ApoE. Estas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad cardiovascular, dislipidemia, recuperación de lesión traumática del cerebro, recuperación de eventos isquémicos del cerebro, respuesta a los anestésicos, y respuesta a los fármacos utilizados para tratar la AD y las enfermedades de esta lista.

Estos polimorfismos también podrían ser utilizados en los esfuerzos de descubrimiento de fármacos para la selección de compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades influenciadas por la variación en las proteínas del gen TOMM40 o el alelo ApoE o las variantes del gen.

Además, las variantes pueden influenciar o determinar las terapias basadas en biofarmacéuticos con objetivos específicos

como los que son ejemplificados por los anticuerpos monoclonales y las moléculas de siARN.

El polimorfismos del DIP en el gen TOMM40 que aquí se describe puede ser identificado de una muestra de ADN del
5 individuo utilizando muchas metodologías de análisis diferentes de nucleótidos moleculares, incluyendo, pero sin limitarse a, la elaboración de secuencias de ADN con los cebadores indicados en la Tabla 4 que se presenta más adelante.

**EJEMPLO 5: Los aparatos poli-T más largos en el rs10524523
10 son correlacionados de manera importante con la edad de
presentación de la LOAD más temprana**

El análisis filogenético ha sido utilizado para identificar las relaciones genómicas entre variantes genéticas de baja frecuencia y para aglomerar los haplotipos relacionados con la
15 evolución (Hahn y asociados, Evidencia de genética y filogenética de la población para la selección positiva de las mutaciones regulatorias de los lugares del factor VII en los humanos. *Genetics* **167**, páginas 867 a 877 (2004)). Esta metodología fue empleada para explorar el bloque LD del ApoE-
20 TOMM40 para la existencia de determinantes de riesgo novedosas para la LOAD. En un estudio exploratorio, 23 Kb de ADN con un contenido de los genes TOMM40 y ApoE fueron amplificados y se elaboraron las secuencias, y fueron determinados los haplotipos resueltos por fase, para 72 casos
25 de la LOAD y controles cotejados de 60 años de edad (Li y

asociados, Polimorfismos de nucleótidos-un solo candidato de un estudio de asociación a nivel genoma de la enfermedad de Alzheimer. *Arch Neurol* **65**, páginas 45 a 53 (2008)). Fue posible construir un árbol filogenético diferente para 10 Kb, codificando los exones del 2 al 10, de esta región. Dos categorías (A y B) fueron distinguidas con un soporte de tirante fuerte (98%, 1000 duplicados). Existió una diferencia importante en la distribución de los genotipos del alelo ApoE entre las dos categorías de los haplotipos del gen TOMM40 en este árbol filogenético, sugiriendo que esta región podría ser importante funcionalmente. Ambas categorías contenían sujetos con el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$, pero el 98% de todos los haplotipos de la categoría B ocurrieron en *cis* con el alelo ApoE $\epsilon 3$ ($P = 1.2 \times 10^{-18}$, prueba exacta de Fisher, de dos colas).

La estructura filogenética de esta región de 10 Kb del gen TOMM40, la herencia específica del alelo ApoE $\epsilon 3$ en haplotipos particulares, y para identificar los polimorfismos específicos de la categoría posteriormente se confirmaron en dos cohortes de control/casos independientes de la LOAD, incluyendo un cohorte con una condición de la AD confirmada-por autopsia y datos de la edad de presentación de la enfermedad. La asociación entre las dos categorías y el riesgo de enfermedad y presentación de la enfermedad, en donde los datos estuvieron disponibles, también fueron explorados para estos dos cohortes. El primer cohorte (AS) comprendía casos de AD ($n =$

74) y los controles ($n = 31$) aseguraron en el Centro de Investigación de la Enfermedad de Alzheimer de Arizona (ADRC). El segundo cohorte (DS) fue ensamblado en el ADRC de Duke Bryan y comprendía sujetos de ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$ solamente
5 (40 casos confirmados por autopsia con edad de presentación de la enfermedad conocida y 33 controles) (Tabla 2). Aunque la elaboración de secuencias de ADN fue exitosa para un subconjunto del cohorte DS quienes tuvieron una presentación de la enfermedad de los 50 a los 68 años de edad, los análisis
10 de asociación fueron limitados a un subconjunto de pacientes quienes desarrollaron la AD después de la edad de 60.

Tabla 2. Composiciones de cohorte. El número de casos y controles, edad promedio, y porcentaje que son mujeres se muestran en cada serie. La edad promedio es proporcionada
15 como la edad en la diagnosis de los casos de la AD y la edad en el examen para los controles. La desviación estándar del promedio se proporciona entre paréntesis.

Series	<i>n</i>		Edad Promedio (SD)		% de Mujeres	
	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
AS	74	31	81.7 (8.01)	77 (8.93)	56.3	46.7
DS	40	33	69.3 (8.3)	71.9 (7.5)	70	66.7

Un árbol filogenético de estructura similar al generado en el estudio exploratorio fue desarrollado con un soporte de tirante fuerte (97%, 1000 duplicados) para el cohorte AS. Los
25 sujetos ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$ ocurrieron solamente en la clasificación A

(separación del 98% entre los grupos, $P = 2.0 \times 10^{-4}$ prueba exacta de Fisher, de dos colas), mientras que los genotipos ApoE restantes fueron distribuidos entre las categorías A y B (figura 6). Eso es, que el alelo ApoE $\epsilon 4$ siempre en LD con
5 variantes en la categoría A mientras que ocurrieron ApoE $\epsilon 3$ en ambos haplotipos de la categoría A y la categoría B. El examen de la distribución de unos cuantos sujetos de ApoE $\epsilon 2/\epsilon 4$ en el árbol filogenético sugiere que los haplotipos ApoE $\epsilon 2$ -TOMM40 comparten una historia de evolución similar con los haplotipos
10 ApoE $\epsilon 3$ -TOMM40 (datos no mostrados). Para verificar la estructura filogenética utilizando métodos separados, y para asegurar que la recombinación dentro del intervalo genético no confundía la estructura del árbol filogenético desarrollado como el cohorte AS, también se construyeron redes de haplotipos
15 utilizando la parsimonia estadística (TCS versión 1.21 (Clement y asociados, TCS: un programa de cómputo para calcular las genealogías del gen. *Mol Ecol* 9, páginas 1657 a 1659 (2000))). Las agrupaciones de haplotipo-sujetos mayores derivadas de los dos métodos (parsimonia máxima y TCS) fueron
20 congruentes.

La categoría A fue más frecuentemente asociada con los casos de la AD que lo que fue la categoría B (OR = 1.44, 95% CI = 0.76 - 2.70). Los heterocigotes del haplotipo ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$ (n = 36) fueron analizados para calcular el riesgo de enfermedad
25 asociado con los haplotipos de la categoría A mientras se

controlaba el efecto del alelo ApoE $\epsilon 4$. Existió una tendencia a una incidencia más alta de la LOAD para el subconjunto que fue homocigoto para la categoría A del gen TOMM40 relativa al subconjunto que fue heterocigoto para la categoría A y la categoría B (OR = 1.36, 95% CI = 0.40 - 4.61) y por lo tanto se postuló que por lo menos algo de las variantes del gen TOMM40 que definen la categoría A confieren el riesgo de la LOAD independiente del alelo ApoE $\epsilon 4$.

El análisis de los datos de la secuencia del cohorte AS identificó 39 sitios polimórficos en la región de 10 Kb del gen TOMM40, de los cuales existieron 30 sitios informativos de parsimonia (por lo menos dos nucleótidos diferentes, representado cada uno en por lo menos dos secuencias). De los 30 sitios informativos de parsimonia, 18 tuvieron una frecuencia menor del alelo (MAF) > 0.10 y seis SNPs estuvieron fuera de los límites del gen TOMM40. 10 SNPs ocurrieron exclusivamente en el contexto del alelo ApoE $\epsilon 3$ ($P = 6.07 \times 10^{-50}$, prueba exacta de Fisher, de dos colas, $n = 210$) y nunca fueron observados en los sujetos homocigotos del alelo ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$ ($n = 16$). La mayor parte de las variantes del gen TOMM40 específicos de $\epsilon 3$ estuvieron localizados en las regiones intrónicas.

La figura 7 ilustra 10 SNPs y 6 polimorfismos de inserción/eliminación que distinguen las categorías A y B del gen TOMM40 (en $P < 0.001$) para los sujetos ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$ del

cohorte AS. Estos polimorfismos fueron probados individualmente, y como haplotipos para la asociación con el riesgo de la LOAD (Tabla 3). Las proporciones sueltas para el riesgo de enfermedad para cada alelo de la categoría B, en
5 todos los casos el alelo menor, sugieren que los alelos de la categoría B son protectores del riesgo de la AD en el cohorte AS, sin embargo, en cada caso la asociación perdió estrechamente el significado. Para tomar en cuenta el efecto del alelo ApoE ε4 en las proporciones sueltas reportadas en la
10 Tabla 3, un conjunto equilibrado de 48 casos de la AD y 48 controles de la AD fueron contruidos seleccionando las secuencias al azar de los sujetos ApoE ε3/ε4 de los cohortes conjuntados AS y DS. Nuevamente los SNPs solos no fueron asociados de manera importante con la LOAD en este conjunto
15 de datos equilibrados. Sin embargo, los alelos menores de cuatro de los SNPs (rs8106922, rs1160985, rs760136, rs741780) que distinguieron la categoría B del gen TOMM40 fueron ensayados anteriormente en tres estudios de asociación a nivel genoma de caso/control de la LOAD y se encontraron
20 que eran protectores del riesgo de enfermedad (OR < 1 en cada caso), lo cual es consistente con la tendencia observada en nuestro estudio (Abraham y asociados, Un estudio de asociación a nivel genoma para la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía utilizando la acumulación de ADN. *BMC Med Genomics* 1, página 44 (2008); Carrasquillo y asociados, La

variación genética en PCDH11X está asociada con la susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía. *Nat Genet* **41**, páginas 192 a 198 (2009); Takei y asociados, Estudio de asociación genética sobre, dentro y
5 alrededor del alelo ApoE en la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía en los Japoneses. *Genomics* **93**, páginas 441 a 448 (2009)).

10

15

20

25

Otro polimorfismo que distinguió las dos categorías y, por lo tanto, dos grupos de haplotipos de alelos ApoE $\epsilon 3$, fue una variante poli-T (rs10524523) localizada en el intrón 6 del gen TOMM40. En los cromosomas del alelo ApoE $\epsilon 4$, la variante fue
5 relativamente larga, con una distribución angosta, unimodal de las longitudes (de 21 a 30 residuos T, promedio = 26.78, d.e. = 2.60, $n = 32$), mientras que los cromosomas del alelo ApoE $\epsilon 3$, una distribución bimodal de las longitudes fue evidente con picos en 15.17 (d.e. = 0.85, $n = 36$) y 33.15 (d.e. = 2.09, $n = 55$)
10 en los residuos T (figura 8). Las longitudes más largas de poli-T ($T \geq 27$) segregados casi exclusivamente en la categoría A, la categoría de riesgo más alto, en el cohorte AS ($P = 7.6 \times 10^{-46}$, $n = 210$, prueba exacta de Fisher, de dos colas). La proporción de caso/control para la categoría que contiene las dos
15 longitudes más cortas, más comunes (15 ó 16 residuos T) fue de 1.46 (95% CI = 1.25 - 1.75), y la proporción de caso/control para la categoría de longitud más larga (28, 29, 33 y 34 residuos T) fue de 2.02 (95% CI = 1.13 - 2.87). Los datos mostraron una tendencia a una asociación entre la longitud del
20 rs10524523 poli-T y AD (OR = 1.38, 95% CI = 0.80 - 2.39).

Aunque existen solamente tendencias hacia la asociación de los haplotipos del gen TOMM40 o los polimorfismos individuales con la LOAD para el cohorte AS, existe una asociación importante entre la categoría de longitud poli-T del
25 rs10524523 y la edad de presentación de la LOAD. Esto fue

probado utilizando el cohorte DS de los sujetos ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$ confirmados por autopsia para los cuales habían datos de presentación de la enfermedad. Los alelos poli-T más largos (≥ 27 residuos T) fueron significativamente asociados con la
5 presentación de la enfermedad en una edad mucho más joven (70.5 años $\pm$ 1.2 contra 77.6 años $\pm$ 2.1, $P = 0.02$, $n = 34$) (figura 5).

Por lo tanto, este polimorfismo, impactó de manera importante la edad de presentación de la enfermedad para los
10 individuos portadores del alelo ApoE $\epsilon 3$. También distinguen en las categorías A y B tres de otros polimorfismos de longitud poli-T localizados en el intrón 6 (rs34896370, rs56290633 y rs10602329) pero estos polimorfismos no estuvieron asociados con la edad de presentación de la enfermedad. De un modo
15 similar, no hubo relación entre los haplotipos de los SNPs que distinguen la categoría y la edad de la LOAD, o para un solo SNP, rs8106922, el cual había sido asociado de manera importante con el riesgo de la AD en tres estudios de asociación a nivel genoma (Abraham y asociados, Un estudio de
20 asociación a nivel genoma para la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía utilizando el conjunto de ADN. *BMC Med Genomics* 1, página 44 (2008); Carrasquillo y asociados, La variación genética en PCDH11X está asociada con la susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer de
25 presentación tardía. *Nat Genet* 41, páginas 192 a 198 (2009);

Takei y asociados, Estudio de asociación genética sobre, dentro y alrededor en el alelo ApoE en la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía en los Japoneses. *Genomics* **93**, páginas 441 a 448 (2009)) (datos no mostrados).

5 Concluimos que los aparatos poli-T más largos en rs10524523 están correlacionados de manera importante con la edad de presentación más temprana de la LOAD. La longitud de esta variante es relativamente homogénea, y relativamente larga, en los cromosomas del alelo ApoE ϵ 4, mientras que
10 existen dos categorías de longitudes poli-T enlazadas con los alelos ApoE ϵ 3. Los cromosomas del alelo ApoE ϵ 2 también parecen ser portadores de repeticiones poli-T de longitud variable similares al cromosoma ϵ 3, pero se necesita una investigación adicional para verificar este descubrimiento
15 preliminar y para determinar si las repeticiones poli-T impactan en la edad de presentación de la enfermedad más tardía para los portadores del alelo ApoE ϵ 2.

Aunque es posible que existan otras variantes que influyen la edad de presentación de la LOAD para los individuos que no
20 son homocigos para el alelo ApoE ϵ 4, la longitud del polimorfismo poli-T en el intrón 6 del gen TOMM40 parece ser el predictor genético más poderoso en esta región de enlace y debería ser validado de manera de prospecto. Estos datos sugieren que el genotipo del alelo ApoE de las curvas de la
25 edad de presentación estratificada (Corder y asociados, La

dosis del gen del alelo de apolipoproteína E tipo 4 y el riesgo de la enfermedad de Alzheimer en las familias de presentación tardía. *Science* **261**, páginas 921 a 923 (1993); Li y asociados, Polimorfismos de nucleótidos de un solo candidato de un estudio de asociación a nivel genoma de la enfermedad de Alzheimer. *Arch Neurol* **65**, páginas 45 a 53 (2008)) son, en realidad, conjuntos de curvas reflejando cada gráfica una interacción específica de polimorfismos enlazados en el alelo ApoE y el gen TOMM40. Por lo tanto, estos datos añaden resolución a la predicción de la edad de presentación de la LOAD, dentro de una ventana de 5 a 7 años, para individuos mayores de 60 años de edad. El estudio para validar la asociación de los genotipos del alelo ApoE y los haplotipos del gen TOMM40 o rs10524523 con edad de presentación de la enfermedad están siendo planeados actualmente. Este estudio será un prospecto, de 5 años, un estudio basado en la población conducido en varios grupos étnicos, y será combinado con la prevención o demora del ensayo de fármacos de la presentación de la enfermedad.

20 **MÉTODOS**

Los dos cohortes analizados en este estudio fueron del Centro de Investigación de la Enfermedad de Alzheimer de Arizona (ADRC), Phoenix, Arizona y el Duke Bryan ADRC, Durham, North Carolina. Todos los sujetos fueron de descendencia Europea. Los estudios de Arizona y Duke fueron

aprobados por los consejos de revisión institucional y el consentimiento informado apropiado fue obtenido de todos los participantes. Los datos de edad y género para los casos y controles en cada cohorte se muestran en la Tabla 2. Para el
5 cohorte de Duke, la edad de presentación de la enfermedad fue determinada retrospectivamente y la diagnosis de la enfermedad fue confirmada por medio de la autopsia.

Las muestras fueron colocadas en placas de 96 depósitos para el PCR de rango largo y la elaboración de secuencias de
10 ADN en las Tecnologías Polimórficas de ADN (Alameda, CA).

El PCR de rango largo fue realizado utilizando la Polimerasa de Takara LA Taq (Takara Mirus Bio). La mezcla de reacción y las condiciones del PCR fueron iguales que las recomendadas por el fabricante. El PCR fue realizado en un
15 volumen de 50 μ L con 2.5 U de LA Taq y de 200 a 400 ng de ADN genómico humano. El termociclado se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 94°C, de 1 minuto por 1 ciclo; 94°C, 30 segundos; 57°C, 30 segundos; 68°C, 9 minutos por 14 ciclos; 94°C, 30 segundos; 57°C, 30 segundos; 68°C, 9 minutos +15
20 segundos/ciclo por 16 ciclos; 72°C, 10 minutos por 1 ciclo. Los cebadores para el PCR de rango largo se muestran en la Tabla 4.

25

20

15

10

5

Tabla 4. Lista de cebadores de elaboración de secuencias directos e inversos. Las líneas sombreadas indican los cebadores directos e inversos utilizados para el PCR de rango largo de R2 (Figura 2).

Cebadores Directos				Cebadores Inversos			
Secuencia	Coordenada del Cebador UCSC (del extremo 3' del cebador)	Posición del Cebador en el Producto PCR Clonado (del extremo 3' del cebador)	SEQ ID NO:	Secuencia	Coordenada del Cebador UCSC (del extremo 3' del cebador)	Posición del Cebador en el Producto PCR Clonado (del extremo 3' del cebador)	SEQ ID NO:
AACTCAGAGGCCAGAGATTCTAAGT	50,092,429	25	1	AAACGCCCTAATCCAGCACATTAC	50,101,560	9156	2
CAGGAAACAGCTATGAC	50,092,292	-112	3	CCCACTGGTGTGTA	50,093,034	630	4
GTGTGATGGTGATTCAAC	50,093,038	634	5	GAATAGGGGCTTTCA	50,093,282	878	6
CTGCAGGTATGAAG	50,093,287	883	7	CAATCTCTAGGTGC	50,093,512	1108	8
GTCTGTGCAGATGTG	50,093,601	1197	9	CGGAAGTTGCAGTAAG	50,093,706	1302	10
TACTGCAACTTCCGC	50,093,722	1318	11	AAGTCAAGGTTACACT	50,094,318	1914	12
TCCTGTGTCACACG	50,094,289	1885	13	ACAAGCCTAGGTGACAT	50,094,790	2386	14
CCCAACTAATTTTGTATTTCG	50,094,609	2205	15	CCTGTAATCCAGCTAT	50,095,002	2598	16
ACATTGTGGCCTGTAC	50,095,129	2725	17	TCATCTCTCTGTGAACCTAA	50,095,324	2920	18
CCACATGGGCTGTGT	50,095,603	3199	19	GGCAAAATGACGATCAGT	50,095,804	3400	20
CCCAAGATGCCCAATC	50,096,082	3678	21	GCAGCACCAAGCTAGT	50,096,218	3814	22
AACTCTGAGTGGATGTG	50,096,471	4067	23	GATGGTCTCAATCTCTTTA	50,096,620	4216	24
CTATAGTCCCAACTACTGA	50,096,730	4326	25	TTTTTCCAAAGCATAAACATAGTA	50,096,863	4459	26
AGTCCCGCTACTTA	50,097,080	4676	27	GGGGATGGACAAAGCT	50,097,268	4864	28
ACCACAGGTGTATGCC	50,097,451	5047	29	TGAAAAGGCCCTCTAGAC	50,097,898	5494	30
GAACAGATTATCCGCA	50,097,864	5460	31	CACCCAGATCCAGTT	50,098,141	5737	32
TGTGGATAGCAACTGGAT	50,098,148	5744	33	CAAAAGCCACACTGAAACTT	50,098,231	5827	34
GGGATTCTGAGTAGCA	50,098,469	6065	35	CAGAATCCTGCGT	50,098,526	6122	36
TGCTGCCCTTAAGTCCG	50,098,937	6533	37	ACACTTGAGAAAACCG	50,098,797	6393	38
CTGGGTCAGCTGAT	50,099,350	6946	39	ACAAAGTCTCTATAGCC	50,099,077	6673	40
TGAAAACATCTGGGATTATAAC	50,099,679	7275	41	TAACCTGGGTTGGTT	50,099,429	7025	42
CTGAAAACCCACAATACC	50,099,990	7586	43	AAGTTCCTTTGCTCATCAG	50,099,829	7425	44
ATCTCGGCTCACTGTA	50,100,261	7857	45	GCAAGAGGGAGACTGT	50,100,207	7803	46
GTCAAAAGACCTCTATGC	50,100,739	8335	47	TGTGCTGGATGAATGTA	50,100,567	8163	48
AGGACTCCACAGT	50,101,197	8793	49	TGAGCTCATCCCGT	50,100,960	8556	50
				CCGTGTTCCATTATGAG	50,101,328	8924	51
				GTAAAACGACGGCCAG	50,101,681	9277	52

Los productos PCR fueron operados en un gel de agarosa al 0.8%, visualizados por medio de tinte de cristal violeta, y comparados con los estándares de tamaño, cortados del gel, y extractados con materiales de purificación incluidos con el equipo de Clonación PCR TOPO XL (Invitrogen). Los productos PCR de rango largo fueron clonados en un vector de clonación de PCR TOPO XL. Este sistema utiliza un vector de clonación TA y se recomienda para insertos de hasta 10 kb. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, las células electro-competentes (del mismo equipo) fueron transformadas por el vector, colocadas en placas en la presencia del antibiótico, e incubadas. Se recolectaron diez clones de cada placa y fueron cultivados en un formato de 96 depósitos.

Los cultivos diluidos fueron transferidos a un regulador de desnaturalización que fue parte del equipo Amplificación de Plantilla de Elaboración de Secuencias de ADN de TempliPhi (GE HealthCare/Amersham Biosciences). Este regulador ocasiona la liberación del ADN plásmido pero no el ADN bacterial. Los cultivos fueron calentados, enfriados, hilados, y transferidos a placas frescas con un contenido de la enzima TempliPhi y otros componentes. Esta mezcla fue incubada a una temperatura de 30°C durante 18 horas para promover la amplificación de las plantillas plásmidas. Estos productos entonces fueron hilados y calentados a una temperatura de 65°C para destruir la enzima.

Las plantillas plásmidas fueron utilizadas en las reacciones de elaboración de secuencias de ADN utilizando el equipo de elaboración de secuencias Big Dye, versión 3.1 (Applied Biosystems). Para cada reacción, se utilizó un cebador de elaboración de secuencias apropiado (Tabla 4) que fue diseñado para reconocer a una ubicación única de la plantilla. La elaboración de secuencias del ciclo se llevó a cabo con una temperatura de recocido de 50°C, una temperatura de alargamiento de 60°C, y una temperatura de desnaturalización de 96°C, por un total de 30 ciclos. Los productos de la reacción de elaboración de secuencias fueron operados en un elaborador de secuencias de ADN ABI 3730XL con una adaptación capilar de 50 cm utilizando el modo de operación estándar.

Un programa de análisis de la elaboración de secuencias de propietario denominado "Agente" (desarrollado por Celera) fue usado para alinear las lecturas de la elaboración de secuencias a la secuencia de referencia apropiada, y producir los "contiguos" asociados con cada clon. El sistema proporciona calificaciones de calidad estimadas para todas las bases para las cuales existe cualquier variación para cualquiera de las muestras. El reporte de elaboración de secuencias para cada muestra fue analizado por la presencia de los SNP que fueron correlacionados en un patrón de haplotipo para un subconjunto de clones y en un patrón de haplotipos diferentes para los clones restantes. Un archivo de referencia para la región de

interés fue preparado haciendo una lista de las variaciones conocidas para esa región que se encuentra disponible públicamente a partir del dbSNP del NCBI. Un archivo del genotipo de la región de interés fue creado buscando cada
5 reporte de haplotipo del sujeto para todas las variaciones entre la secuencia de referencia conocida y las secuencias de haplotipo de consenso.

La magnitud del error de lectura de la longitud para las variantes poli-T (por ejemplo, rs10524523) fue estimada
10 examinando las longitudes observadas de los 10 clones que fueron preparados para las muestras que tenían un solo haplotipo. Para una muestra típica con una longitud corta de 16 del poli-T, la desviación estándar para los 10 clones fue de 0.97. Para una muestra típica con una longitud más larga del
15 poli-T, por ejemplo, 27, la desviación estándar fue de 1.58.

Se realizó un análisis filogenético. Se llevó a cabo una alineación de secuencias múltiples de las secuencias utilizando un programa ClustalW2 (versión 2.0.10) utilizando parámetros por omisión (default). Los ajustes manuales de las alineaciones
20 fueron completados utilizando el programa Genedoc (versión 2.7.000). Los árboles filogenéticos fueron contruidos utilizando las reconstrucciones Bayesianas, basadas en la distancia y la probabilidad máxima. El software de construcción del árbol filogenético utilizado fue el Paup* (versión 4.0b10), ClustalX2
25 (métodos de unión de vecinos, versión 2.0.10) y Mr. Bayes

(versión 3.1.2).

Se utilizaron en todos los métodos el intercambio de la
rama de tres bisecciones y reconexión. El mejor método de
adaptación de elaboración de secuencias fue estimado
5 utilizando el programa Modeltest (versión 3.7) el cual
proporcionó los estimados para las siguientes determinantes
clave: matriz de la calificación, forma de la distribución gama y
proporción de los sitios invariantes. El análisis de los tirantes
fue realizado utilizando 1000 duplicados para determinar el
10 soporte estadístico para la morfología específica del árbol.

También se construyeron redes de haplotipos de los datos
de las secuencias utilizando el programa TCS (versión 1.21
(Clement y asociados, TCS: un programa de cómputo para
estimar las genealogías del gen. *Mol Ecol* **9**, páginas 1657 a
15 1659 (2000))) para comparar los árboles filogenéticos con los
cladogramas estimados utilizando la parsimonia estadística. Los
árboles filogenéticos y las redes de haplotipos fueron
construidas dos veces, tratando los espacios como datos
faltantes para el primer caso y como un quinto carácter para el
20 segundo caso. La diversidad de nucleótidos en la región de
interés fue calculada utilizando el programa DnaSP (versión
5.00.02 (Librado y asociados, DnaSP v5: un software para el
análisis extenso de los datos del polimorfismo de ADN.
Bioinformatics **25**, páginas 1451 a 1452 (2009))). Después de la
25 construcción de los árboles filogenéticos, la red de haplotipos,

y la terminación del análisis de la diversidad de nucleótidos en la región de interés, los resultados de los métodos diferentes fueron comparados y conciliados a un árbol de consenso. Los grupos de secuencias que comparten una mutación reciente de la enfermedad se presumía que se separaba más cercanamente en el árbol filogenético, sin embargo, los casos esporádicos debidos a las fenocopias, la dominancia y la epistasis pueden introducir ruido dentro de la relación de fenotipo-haplotipo (Tachmazidou y asociados, Elaboración de mapas de asociación genética por medio de la acumulación basada en la evolución de los haplotipos. *PLoS Genet* 3, página e111 (2007)).

Sin embargo, los casos esporádicos debidos a las fenocopias, la dominancia y la epistasis pueden introducir ruido en la relación de fenotipo-haplotipo. Este análisis filogenético enfocado a un nivel alto de agregación de las categorías con el objeto de minimizar estos efectos. Las categorías determinadas en la primera división en el árbol filogenético fueron utilizadas para probar la hipótesis de que los haplotipos de los sujetos del gen TOMM40 de la categoría 'B' fueron asociados con la presentación de la AD en una edad más tardía que los haplotipos de los sujetos de la categoría 'A', (cada sujeto contribuyó con dos haplotipos a la señal de asociación con la edad de presentación de la AD). El número de pruebas de asociación que son realizadas utilizando este método fueron de órdenes de magnitud menores que los estudios de asociación a

nivel genoma típicos ya que el análisis filogenético identificó categorías de sujetos-haplotipos relacionados con la evolución. Si las pruebas de asociación confirmaron que las diferentes categorías clasificadas clasificaron los datos de sujeto-haplotipo por edad de presentación, además se hizo el análisis estadístico para identificar las variantes que separaron las secuencias de cada categoría. Efectivamente, este análisis evaluó la importancia de cada variante como un factor que influye en la edad de presentación utilizando una serie de un grado de pruebas de libertad guiado por una estructura del árbol. El análisis filogenético fue realizado utilizando un solo nucleótido y los polimorfismos de inserción/eliminación. Las pruebas de asociación estadísticas fueron ajustadas con una corrección de Bonferroni para el número de ciclos polimórficos incluidos en el análisis.

Los reportes del haplotipo del software del análisis Polimórfico y los reportes del software DnaSP (versión 5.00.02 (Librado y asociados, DnaSP v5: un software para el análisis extenso de los datos de polimorfismo de ADN. *Bioinformatics* 25, páginas 1451 a 1452 (2009))) fueron utilizados para el análisis estadístico posterior. Analizamos las variantes SNP del gen TOMM40 individual, los haplotipos del gen TOMM40 y la longitud de las repeticiones poli-T para la asociación con el riesgo de la LOAD para el cohorte AS y la edad de presentación de la LOAD para el cohorte DS. Las diferencias en las

proporciones de los alelos específicos del gen TOMM40 asociados con cada alelo ApoE o genotipo ApoE fueron comparados utilizando la prueba exacta de Fisher (de dos colas). Iniciando con 30 sitios informativos de parsimonia y $\alpha =$
5 0.05, una corrección de Bonferroni para la importancia de la asociación alélica específica requeriría un valor P de 0.001. Las proporciones de los aislados (OR) fueron calculadas como el (número de alelos menores en los casos/número de alelos menores en los controles)/(número de alelos mayores en
10 casos/número de alelos mayores en los controles) y reportados en un intervalo de confianza del 95%. Los promedios de los grupos de edad de presentación de la LOAD definidos fueron comparados mediante las pruebas *t*, de dos colas. Una prueba estándar *F* en las variaciones del grupo se realizó para
15 determinar si la prueba *t* era calculada suponiendo variaciones iguales o desiguales. El análisis estadístico fue completado utilizando el software JMP (versión 8, SAS Institute, Cary, NC).

Códigos de Acceso: GenBank: gen TOMM40, translocasa de la membrana externa de la mitocondria homóloga 40, 10452;
20 ApoE, apolipoproteína E, 348.

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no deberá interpretarse como limitativo de la misma. La presente invención se define por las reivindicaciones siguientes, estando incluidas en las mismas los equivalentes de las
25 reivindicaciones.

RESUMEN

Aquí se proporciona un método para la identificación de una variante genética que está asociada con el desarrollo de un padecimiento de interés (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer), y las variantes genéticas identificadas de esta manera. También se proporcionan métodos de tratamiento con un ingrediente activo (por ejemplo, con un agente activo particular y/o en una etapa más temprana), al momento de detectar una variante genética aquí descrita. En algunas modalidades, la variante genética es un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40. También se proporcionan los equipos para determinar si un sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía. Además se proporcionan equipos para determinar si un sujeto actúa en respuesta al tratamiento para un padecimiento de interés con un agente activo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una variante genética que está asociada con el desarrollo de un padecimiento de interés, el cual comprende:

5 (a) determinar de las muestras biológicas que contienen el ADN las secuencias de nucleótidos portadas por una pluralidad de sujetos humanos individuales en un lugar genético de interés, en donde dichos sujetos incluyen tanto (i) sujetos afectados con el padecimiento de interés como (ii) sujetos no
10 afectados con el padecimiento de interés;

 (b) realizar el análisis de alineación de secuencias múltiples para identificar las variantes genéticas en dichos lugares genéticos de las secuencias de nucleótidos observadas en dicha pluralidad de sujetos;

15 (c) mapear dichas variantes genéticas para construir un árbol filogenético de dichos sujetos, comprendiendo dicho árbol las ramas que identifican los cambios de variante entre dichos sujetos y el mismo cistrón;

 (d) examinar las variantes genéticas representadas como
20 ramas en dicho árbol y determinar la proporción de sujetos afectados y no afectados para identificar esos cambios que conducen a una proporción cambiada de sujetos afectados a no afectados; y entonces

 (e) identificar una variante genética en donde la
25 proporción de sujetos afectados a sujetos no afectados es de

por lo menos 5% diferente de una a más variantes adyacentes en dicho árbol,

para identificar de esa manera una variante genética asociada con el desarrollo de dicho padecimiento de interés.

5 2. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque todos los sujetos portan el mismo polimorfismo conocido para dicho padecimiento de interés.

3. El método tal y como se describe en la reivindicación 1 o reivindicación 2, caracterizado porque el polimorfismo
10 conocido es un alelo de Apolipoproteína E.

4. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizado porque el lugar genético de interés se encuentra en el desequilibrio del enlace con el polimorfismo conocido.

15 5. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizado porque el lugar genético de interés se encuentra en el mismo cromosoma y está a menos de 10, 20, 30, 40, ó 50 kilobases lejos del polimorfismo conocido.

20 6. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizado porque dicho lugar genético es el gen TOMM40.

7. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizado porque dicho
25 padecimiento de interés está asociado con la disfunción

aumentada o disminuida de la mitocondria.

8. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque dicho padecimiento de interés es una enfermedad neurodegenerativa,
5 una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad psiquiátrica, o cáncer.

9. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es una enfermedad de la arteria
10 coronaria.

10. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es diabetes melitus tipo II.

11. El método tal y como se describe en cualquiera de las
15 reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es la enfermedad de Parkinson.

12. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es la enfermedad de Alzheimer.

20 13. Un método para determinar el riesgo aumentado para el desarrollo del padecimiento de interés, el cual comprende:

(a) determinar de una muestra biológica que contiene el ADN una variante genética identificada por el método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12
25 portado por un sujeto individual; y luego

(b) determinar que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado para el desarrollo del padecimiento de interés cuando dicha variante genética está presente.

14. Un método para determinar un riesgo aumentado para
5 el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, el cual comprende:

(a) detectar de una muestra biológica que contiene el ADN tomado de dicho sujeto la presencia o ausencia de una variante genética del gen TOMM40 asociada con el riesgo aumentado o
10 disminuido de la enfermedad de Alzheimer, en donde dicha variante es un polimorfismo de eliminación/inserción en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(b) determinar que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado o disminuido de la enfermedad de Alzheimer cuando
15 dicha variante genética está presente o ausente.

15. El método tal y como se describe en la reivindicación 14, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

20 16. El método tal y como se describe en la reivindicación 14, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

17. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 14 a la 16, el cual comprende además los
25 pasos de:

(c) administrar un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer a dicho sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento cuando dicho sujeto es determinado que se encuentra en un riesgo aumentado de la enfermedad de Alzheimer.

18. El método tal y como se describe en la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de administración se lleva a cabo en dicho sujeto en una edad más temprana cuando se ha determinado que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado por la presencia o ausencia de dicha variante genética comparado con un sujeto en el cual dicha variante genética no está presente o está ausente.

19. El método tal y como se describe en la reivindicación 17 o reivindicación 18, caracterizado porque el agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

20. El método tal y como se describe en la reivindicación 17 o reivindicación 18, caracterizado porque el agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

21. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 14 a la 20, caracterizado porque dicha

variante genética del gen TOMM40 es una variante de inserción poli-T en la ubicación genómica 50,094,889 de la Construcción 36.3 del NCBI.

22. Un método de tratamiento de un sujeto para la
5 enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer a dicho sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento; comprendiendo la mejora:

la administración de dicho agente activo a dicho sujeto en
10 una etapa más temprana cuando dicho sujeto es el portador de la variante genética del gen TOMM40 asociado con el riesgo aumentado de la enfermedad de Alzheimer comparado con un sujeto correspondiente quien no es el portador de dicha variante genética,

15 en donde dicha variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40.

23. El método tal y como se describe en la reivindicación 22, el cual comprende además detectar si dicho sujeto es un
20 sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

24. El método tal y como se describe en la reivindicación 23, el cual comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

25. El método tal y como se describe en cualquiera de las
25 reivindicaciones de la 22 a la 24, caracterizado porque dicho

agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, 5 moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

26. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 24, caracterizado porque dicho agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente 10 aceptable de la misma.

27. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque la variante genética del gen TOMM40 es una variante seleccionada del grupo consistente de: rs10524523, 15 rs10602329, y DIP3.

28. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

29. El método tal y como se describe en cualquiera de las 20 reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

30. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 es rs10524523.

25 31. El método tal y como se describe en cualquiera de las

reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T que tiene un poli-T de al menos 27 pares básicos contiguos.

32. El método tal y como se describe en cualquiera de las
5 reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T que tiene un poli-T de al menos 27 pares básicos contiguos en el rs10524523.

33. Un método de tratamiento para un padecimiento de
10 interés, en donde dicho padecimiento de interés está asociado con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40, para un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método:

(a) determinar la presencia o ausencia de una variante genética identificada mediante el método tal y como se describe
15 en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12 portada por un sujeto individual para generar un perfil genético de dicho paciente; y luego, si dicho perfil indica que el paciente actúa en respuesta a un agente activo,

(b) administrar dicho agente activo al sujeto en una
20 cantidad de tratamiento efectiva para tratar dicho padecimiento de interés.

34. El método tal y como se describe en la reivindicación 33, caracterizado porque dicho agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa,
25 antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores

del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

35. El método tal y como se describe en la reivindicación
5 33, caracterizado porque dicho agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

36. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 33 a la 35, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 es una variante del gen
10 TOMM40 que está en una ubicación genética de la Construcción 36.3 del NCBI seleccionada del grupo consistente de: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531,
15 50,096,647, 50,096,697, 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, y 50,099,628.

37. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 33 a la 36, caracterizado porque la variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de
20 eliminación/inserción (DIP).

38. El método tal y como se describe en la reivindicación 37, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

39. El método tal y como se describe en la reivindicación
25 37, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de

eliminación/inserción de poli-T.

40. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 37 a la 39, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

5 41. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 37 a la 39, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

42. Un método de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende:

10 (a) detectar de una muestra biológica que contiene el ADN tomado de dicho sujeto la presencia o ausencia de una variante genética del gen TOMM40 asociada con la capacidad de respuesta para un agente activo; y, si dicha variante genética está presente,

15 (b) administrar dicho agente activo a dicho sujeto en una cantidad de tratamiento efectiva para tratar la enfermedad de Alzheimer.

43. El método tal y como se describe en la reivindicación 42, caracterizado porque comprende además detectar si dicho
20 sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

44. El método tal y como se describe en la reivindicación 42, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

25 45. El método tal y como se describe en cualquiera de las

reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizado porque dicho agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del
5 proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

46. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizado porque el
10 agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

47. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 46, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 se encuentra en una
15 ubicación genética de la Construcción 36.3 del NCBI seleccionada del grupo consistente de: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647, 50,096,697,
20 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, y 50,099,628.

48. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 47, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de
25 eliminación/inserción (DIP).

49. El método tal y como se describe en la reivindicación 48, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

50. El método tal y como se describe en la reivindicación 5 48 o reivindicación 49, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

51. El método tal y como se describe en la reivindicación 48 o reivindicación 49, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

10 52. El método tal y como se describe en la reivindicación 48 o reivindicación 49, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

53. El uso de un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer para la preparación de un medicamento para llevar a 15 cabo un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 52.

54. El uso de un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer para llevar a cabo un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 52.

20 55. Un método para determinar un pronóstico o el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que comprende obtener un perfil del paciente, caracterizado porque la obtención del perfil del paciente, comprende:

detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo 25 ApoE 2, ApoE 3, o ApoE 4 en una muestra biológica de dicho

paciente, y

detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40. localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y luego

5 convertir dicho perfil del paciente en un pronóstico, en donde la presencia de dicho alelo ApoE 2, ApoE 3 o ApoE 4 y la presencia de dicho al menos un polimorfismo DIP del gen TOMM40 identifica a dicho paciente como un paciente que se encuentra en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

10 56. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

15 57. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

58. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

20 59. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

60. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 55 a la 59, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

25 61. Un método para estratificar un sujeto en un subgrupo

de un ensayo clínico de una terapia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho método:

5 detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE 2, ApoE 3, o ApoE 4 en una muestra biológica del paciente,

detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y

10 estratificar dicho sujeto en un subgrupo para el ensayo clínico de dicha terapia basada en la presencia o ausencia de dicho al menos un alelo ApoE 2, ApoE 3, o ApoE 4 y/o un alelo del DIP del gen TOMM40.

15 62. El método tal y como se describe en la reivindicación 61, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

63. El método tal y como se describe en la reivindicación 61, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

20 64. El método tal y como se describe en la reivindicación 61, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

65. El método tal y como se describe en la reivindicación 61, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

25 66. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 61 a la 65, caracterizado porque

comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

67. Un método para identificar a un paciente en un ensayo clínico de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer que
5 comprende:

a) identificar un paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer; y

b) determinar un pronóstico para dicho paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer que comprende
10 obtener un perfil del paciente, en donde dicho perfil del paciente comprende,

i) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 en una muestra biológica de dicho paciente,

15 ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y

iii) convertir el perfil del paciente en dicho pronóstico, incluyendo dicho pronóstico una predicción de si el
20 paciente es un candidato para el ensayo clínico para dicho tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

68. El método tal y como se describe en la reivindicación 67, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

25 69. El método tal y como se describe en la reivindicación

67, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

70. El método tal y como se describe en la reivindicación 67, caracterizado porque el DIP es rs10524523, rs10602329 o
5 DIP3.

71. El método tal y como se describe en la reivindicación 67, caracterizado porque el DIP es rs10524523.

72. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 67 a la 71, caracterizado porque
10 comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

73. Un equipo para determinar si un sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la presentación tardía de la enfermedad de Alzheimer el cual comprende:

15 (A) por lo menos un reactivo que detecta específicamente el alelo ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2, en donde dicho reactivo es seleccionado del grupo consistente de anticuerpos que se enlazan selectivamente a las isoformas ApoE, y muestras de oligonucleótidos que se enlazan selectivamente al ADN que
20 codifica los alelos de ApoE;

(B) por lo menos un reactivo que detecta específicamente la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

25 (C) instrucciones para determinar que el sujeto se

encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía por medio de:

(i) detectar la presencia o ausencia de una isoforma ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 en dicho sujeto con dicho al menos un
5 reactivo;

(ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(iii) observar si el sujeto se encuentra o no en un riesgo
10 aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía observando si la presencia del alelo ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 y dicho DIP del gen TOMM40 es o no detectado con dicho al menos un reactivo, en donde la presencia de la isoforma ApoE 3, ApoE 4 y/o ApoE 2 y dicho
15 DIP del gen TOMM40 indica que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía.

74. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73, caracterizado porque dicho al menos un reactivo y dichas
20 instrucciones están empacadas en un solo contenedor.

75. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

76. El equipo tal y como se describe en la reivindicación
25 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es un

polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

77. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

5 78. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

79. El equipo tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 73 a la 78, caracterizado porque dicho
10 paso de determinación comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

80. Un equipo para determinar si el sujeto actúa al tratamiento para un padecimiento de interés, en donde dicho
15 padecimiento de interés está asociado con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40, con un agente activo, comprendiendo dicho equipo:

(A) por lo menos un reactivo que detecta específicamente los alelos ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2, en donde dicho reactivo
20 es seleccionado del grupo consistente de anticuerpos que se enlazan específicamente a las isoformas ApoE, y muestras de oligonucleótidos que se enlazan selectivamente al ADN que codifica los alelos ApoE;

(B) por lo menos un reactivo que detecta específicamente
25 la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de

eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(C) instrucciones para determinar que el sujeto actúa en respuesta al tratamiento para dicho padecimiento de interés con
5 dicho agente activo de interés mediante

(i) detectar la presencia o ausencia de una isoforma ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 en dicho sujeto con dicho al menos un reactivo;

(ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un
10 polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(iii) determinar si el sujeto actúa o no en respuesta con el tratamiento observando si la presencia de las isoformas ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 y dicho DIP del gen TOMM40 es o no
15 detectado en dicho al menos un reactivo, en donde la presencia de las isoformas ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 y dicho DIP del gen TOMM40 indica que dicho sujeto actúa en respuesta a dicho tratamiento con dicho agente activo.

81. El equipo tal y como se describe en la reivindicación
20 80, caracterizado porque dicho al menos un reactivo y dichas instrucciones están empacadas en un solo contenedor.

82. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

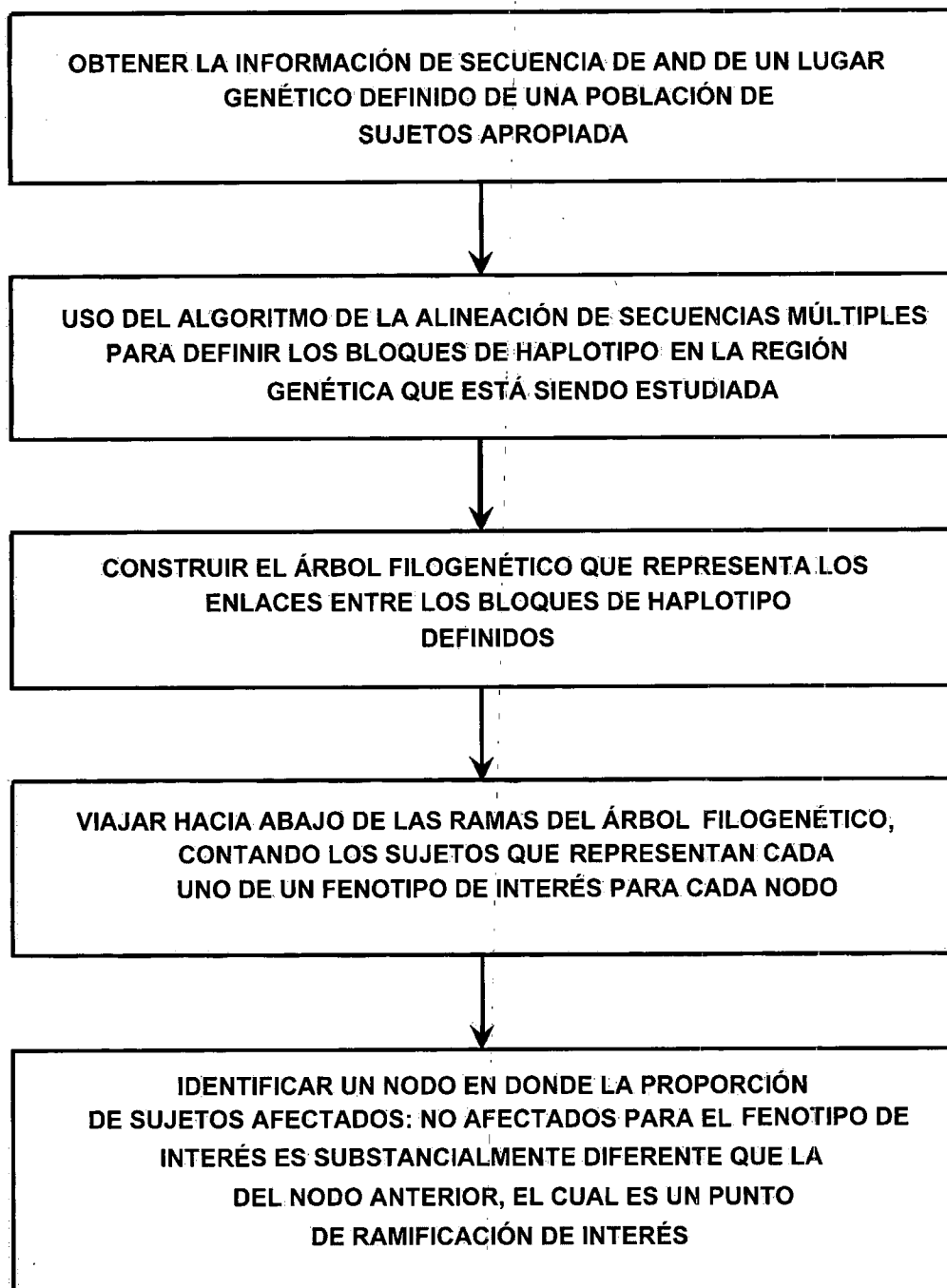
25 83. El equipo tal y como se describe en la reivindicación

80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

84. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es
5 rs10524523, rs10602329 o DIP3.

85. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

86. El equipo tal y como se describe en cualquiera de las
10 reivindicaciones de la 80 a la 85, caracterizado porque el paso de determinación comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

**FIG. 1**

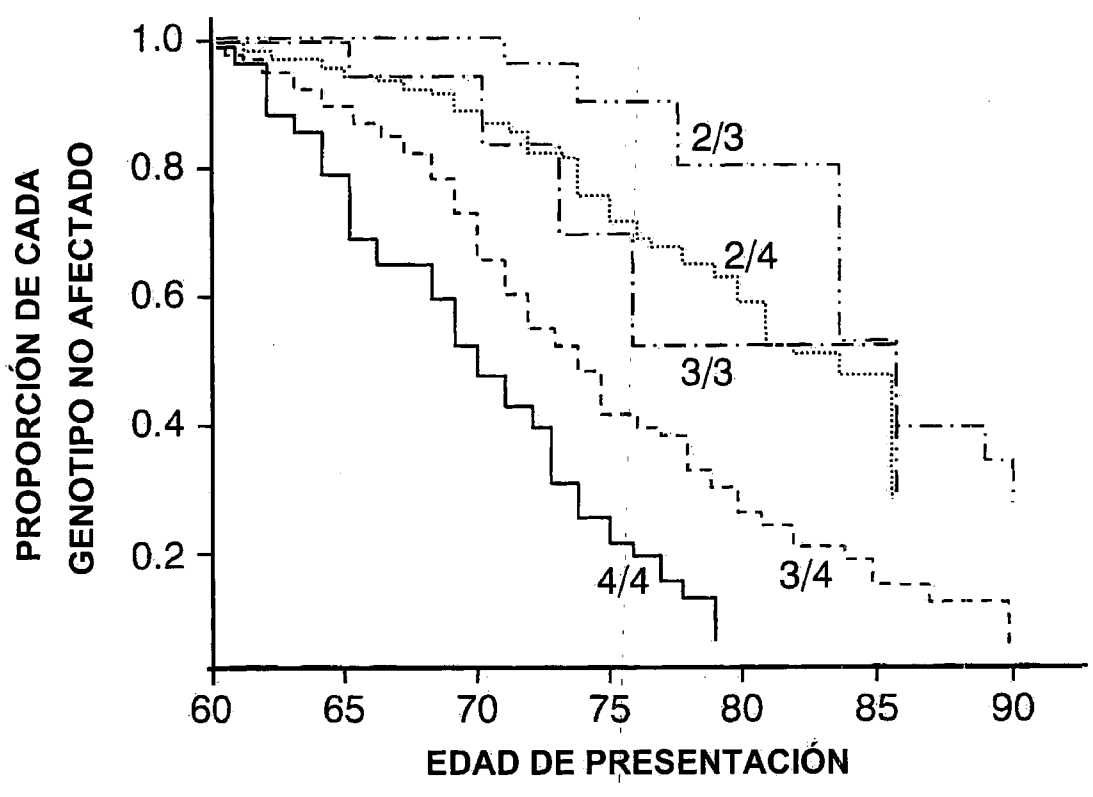


FIG. 2

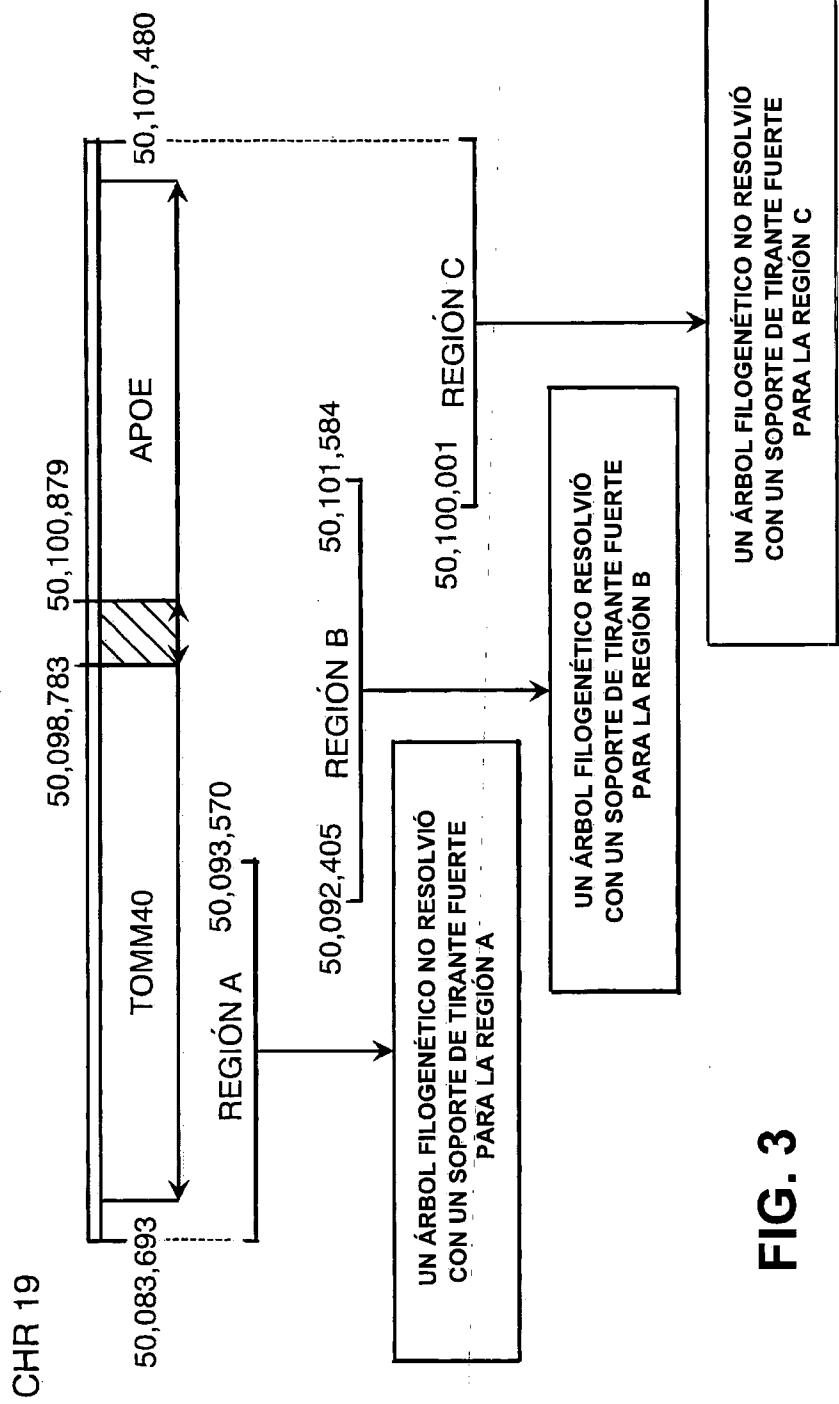


FIG. 3

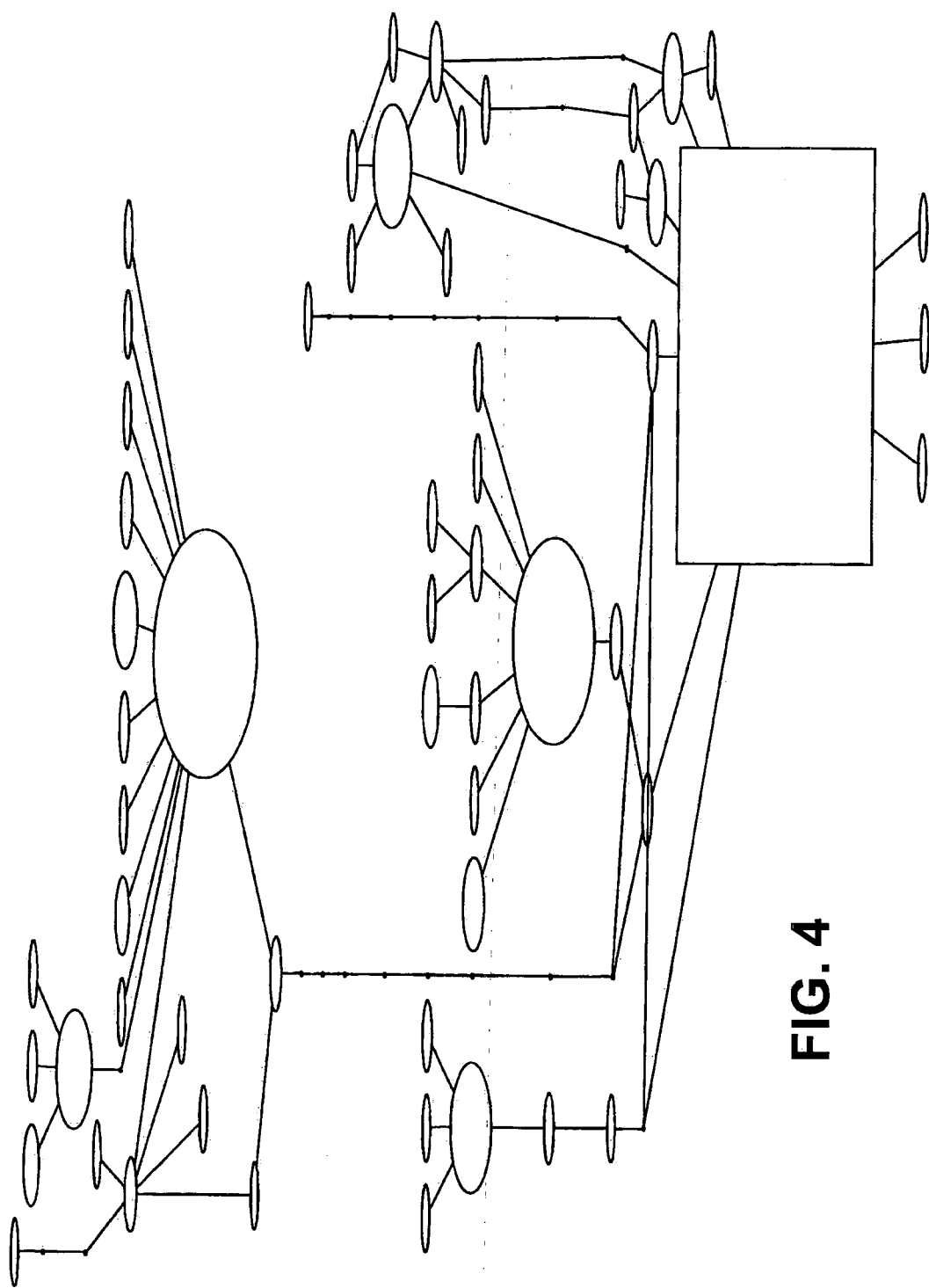


FIG. 4

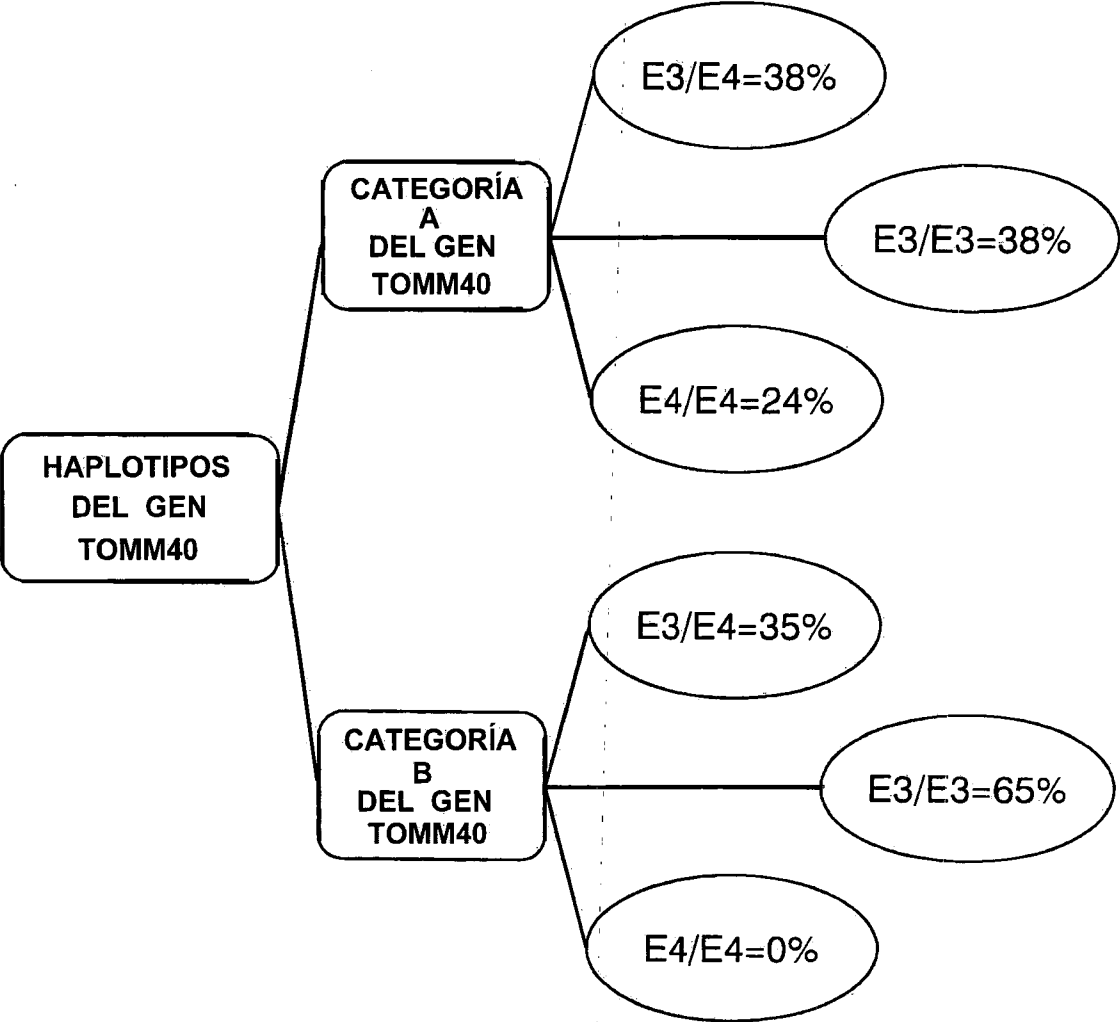


FIG. 5

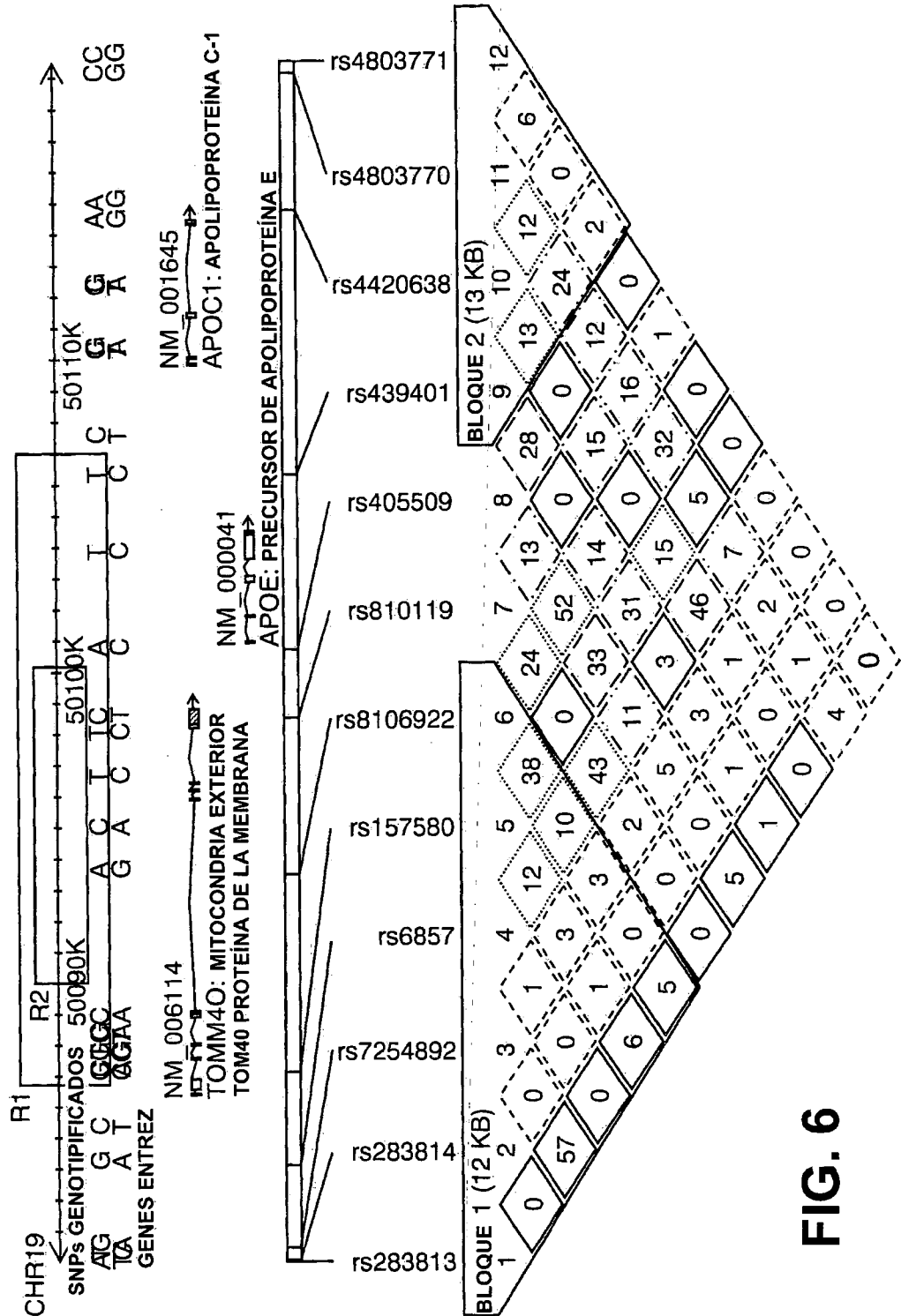


FIG. 6

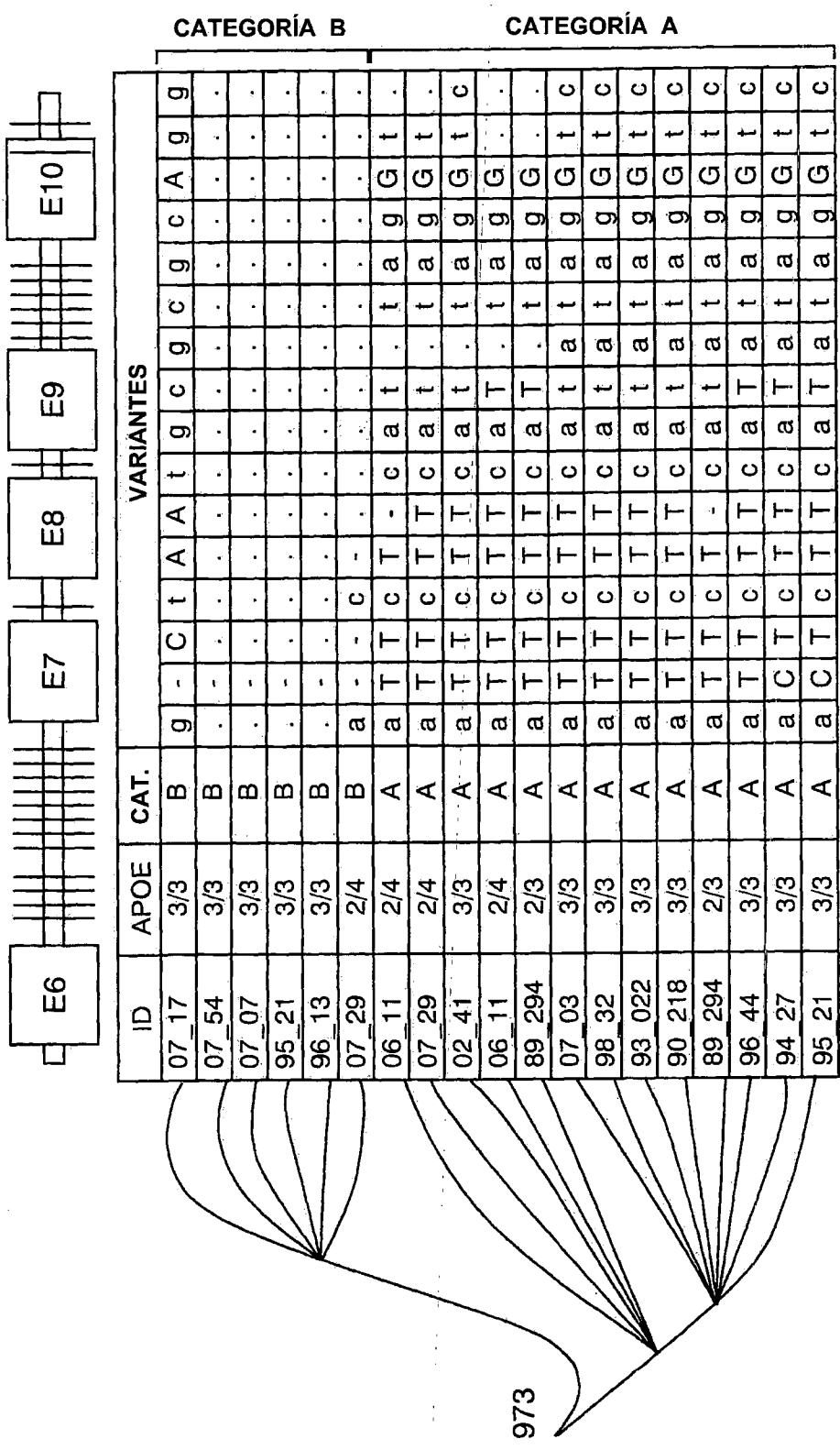


FIG. 7A

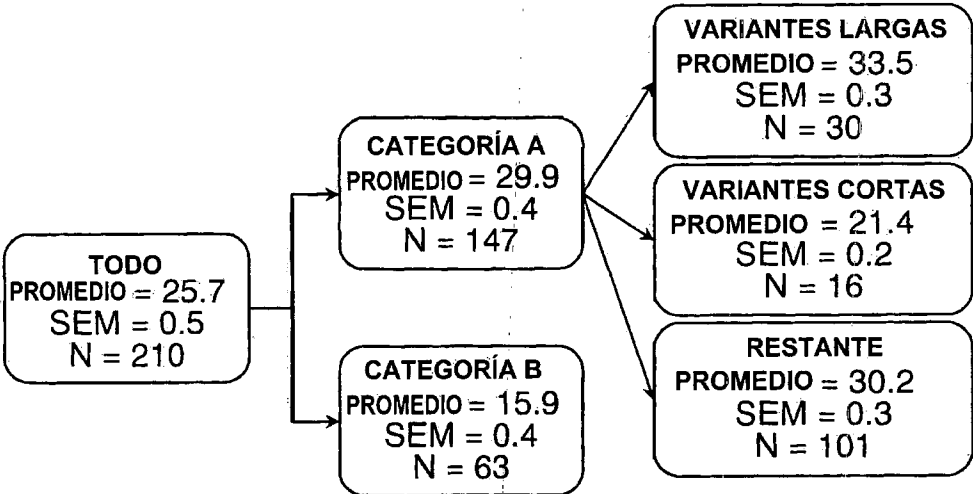


FIG. 7B

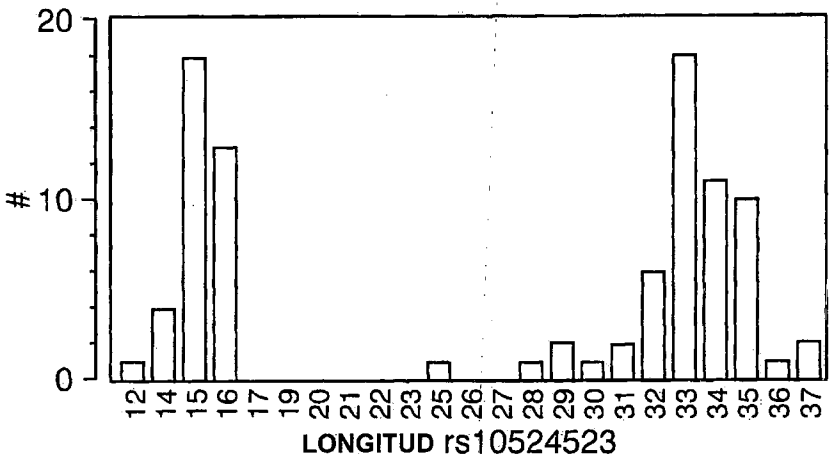


FIG. 8A

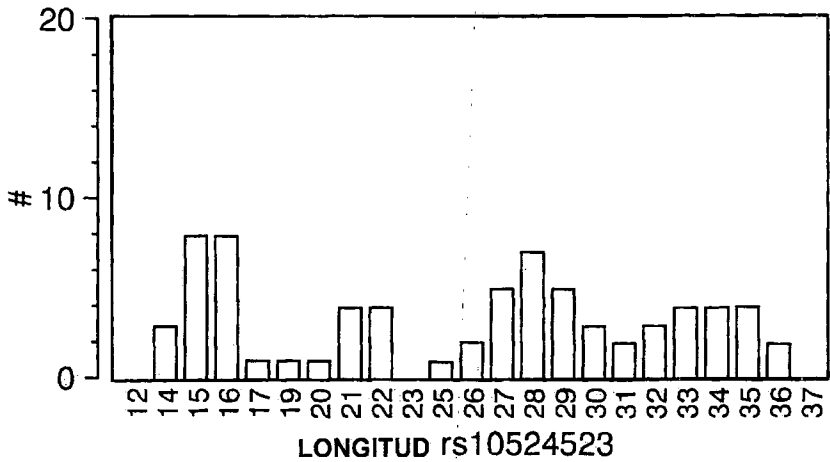


FIG. 8B

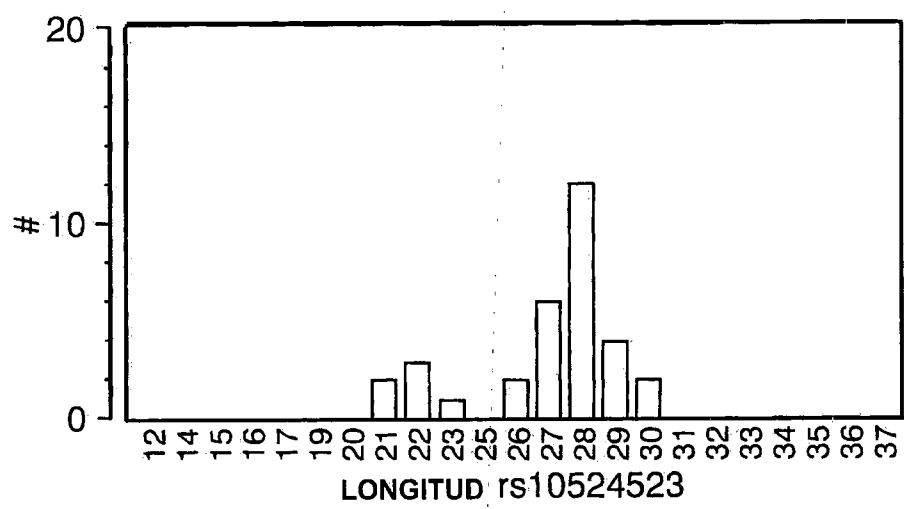


FIG. 8C

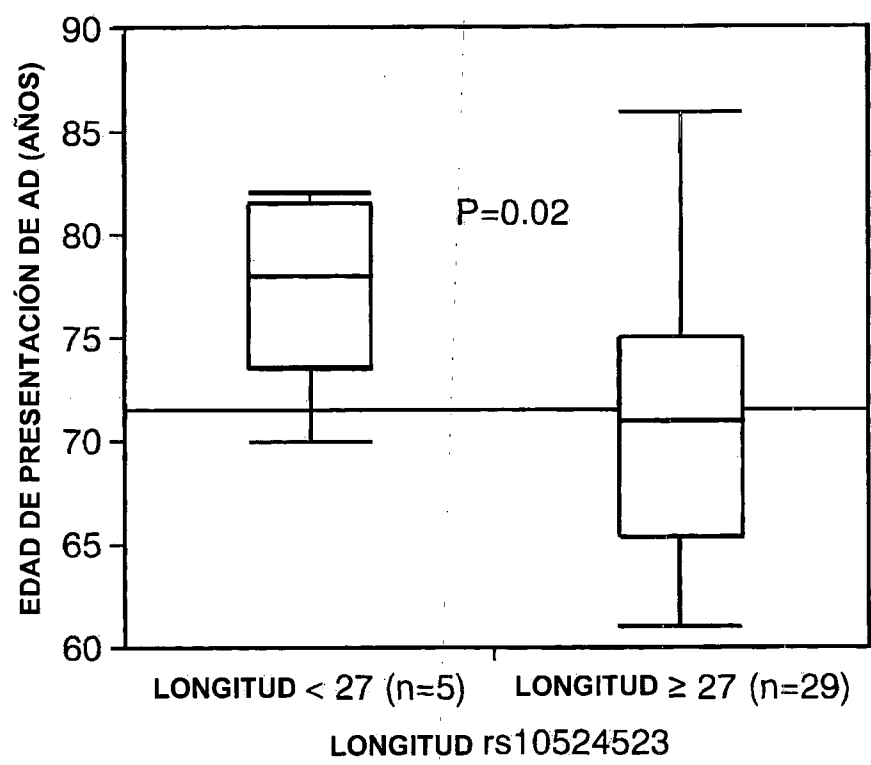


FIG. 9

160

9719-2WO_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Shiraz Pharmaceuticals, Inc.
Roses, Alan D.

<120> METHOD OF IDENTIFYING DISEASE RISK FACTORS

<130> 9719-2WO

<150> US 61/224,647
<151> 2009-07-10

<150> US 61/186,673
<151> 2009-06-12

<150> US 61/088,203
<151> 2008-08-12

<160> 52

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Long range PCR primer

<400> 1
aactcagagg ccagagattc taagt 25

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Long range PCR primer

<400> 2
aacagcctaa tcccagcaca ttac 25

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 3
caggaaacag ctatgac 17

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 4
cccactgggtt gttga 15

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

161

<400> 5 gtgtgatggt gattcaac	18
<210> 6 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 6 gaataggggc ctttca	16
<210> 7 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 7 ctgcaggtat gaaag	15
<210> 8 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 8 caatctccta ggggtgc	16
<210> 9 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 9 gtctctgcag atgtg	15
<210> 10 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 10 cggaagttgc agtaag	16
<210> 11 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 11 tactgcaact tccgc	15

9719-2WO_ST25

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 12
aaggtcaagg ttacact

17

<210> 13
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 13
tctctgttgc ccacg

15

<210> 14
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 14
acaagcctag gtgacat

17

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 15
cccaactaat ttttgtattc g

21

<210> 16
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 16
cctgtaatcc cagctat

17

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 17
acatttgtgg cctgtac

17

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	18	
	tcatctctct gtgaacctaa	20
<210>	19	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	19	
	ccacatgggc ttgtgt	16
<210>	20	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	20	
	ggcaaatga cgatcagt	18
<210>	21	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	21	
	cccagatgcc caaatc	16
<210>	22	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	22	
	gcagcaccag ctagt	15
<210>	23	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	23	
	aactctgagt ggatgtg	17
<210>	24	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	24	
	gatggtctca atctcctta	19

164

<210>	25	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	25	
	ctatagtccc aactactga	19
<210>	26	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	26	
	ttttttccaa gcataaaaca tagta	25
<210>	27	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	27	
	agtccccgct actta	15
<210>	28	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	28	
	ggggatggac aaagct	16
<210>	29	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	29	
	accacaggtg tatgcc	16
<210>	30	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	30	
	tgaaaagccc tctagac	17
<210>	31	
<211>	17	
<212>	DNA	

<213> Artificial

<220>

<223> Sequencing primer

<400> 31

gaacagattc atccgca

17

<210> 32

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequencing primer

<400> 32

cacccacgat ccagtt

16

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequencing primer

<400> 33

tgtggatagc aactggat

18

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequencing primer

<400> 34

caaagccaca ctgaaactt

19

<210> 35

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequencing primer

<400> 35

gggattctga gtagca

16

<210> 36

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequencing primer

<400> 36

cagaatcctg cgt

13

<210> 37

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequencing primer

<400> 37 tgctgcctta agtccg	16
<210> 38 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 38 acacttgaga aaacgg	16
<210> 39 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 39 ctggggtcag ctgat	15
<210> 40 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 40 acaaagtcct ctatagcc	18
<210> 41 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 41 tgaaacatct gggatttata ac	22
<210> 42 <211> 16 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 42 taacctgggg ttggtt	16
<210> 43 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Sequencing primer	
<400> 43 ctggaaacca caatacc	17
<210> 44	

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	44	
	aagttccttt gctcatcag	19
<210>	45	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	45	
	atctcggctc actgta	16
<210>	46	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	46	
	gcaagaggga gactgt	16
<210>	47	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	47	
	gtcaaaagac ctctatgc	18
<210>	48	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	48	
	tgtgcctgga tgaatgta	18
<210>	49	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Sequencing primer	
<400>	49	
	aggactccac gagt	14
<210>	50	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		

<223> Sequencing primer

<400> 50
tgagctcatc cccgt

15

<210> 51
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 51
ccgtgttcca tttatgag

18

<210> 52
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequencing primer

<400> 52
gtaaaacgac ggccag

16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/53373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/48; G01N 33/50 (2009.01) USPC - 702/20 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 702/20												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6; 702/20 (text search)												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google; PubMed Search terms: TOMM40, translocase of outer mitochondrial membrane 40, alzheimer's, intron, intron 6, intron 9, insertion, deletion, ApoE, phylogenetic tree, linkage disequilibrium, polymorphism												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	TEMPLETON et al. Tree scanning: a method for using haplotype trees in phenotype/genotype association studies. Genetics. January 2005 (01.2005), Vol. 169, No. 1, pages 441-453 abstract; pg 442, para 7 - pg 443, para 1; pg 443, para 2 - pg 444, para 5; Tables 1, 4-7; Fig. 4-6	1-3										
X	US 2006/0228728 A1 (COX et al.) 12 October 2006 (12.10.2006) para [0007], [0019], [0026], [0040], [0239], [0247]-[0248], [0258], [0260], [0291], [0380]; Fig. 1A, sheet 3/30 of the drawings	42, 45										
Y		43-44, 46										
A		14-18, 22-26, 55-78, 80-85										
Y	US 2004/0265849 A1 (CARGILL et al.) 30 December 2004 (30.12.2004) para [0012]	43-44										
A		55-78, 80-85										
Y	LANDRETH et al. PPARgamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. Neurotherapeutics. July 2008 (07.2008), Vol. 5, No. 3, pages 481-489; abstract	46										
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐												
* Special categories of cited documents: <table><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td><td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td>"&" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 6 December 2009 (06.12.2009)		Date of mailing of the international search report 23 FEB 2010										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 09/53373
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)							
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☒ Claims Nos.: 4-13, 19-21, 27-41, 47-54, 79, and 86 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).							
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)							
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. Group I: Claims 1-3 are drawn to a method for identifying a genetic variant that is associated with development of a condition of interest. Group II: Claims 14-18, 22-26, 42-46, 55-78, and 80-85 are drawn to a method of determining increased risk for development of Alzheimer's disease in a subject, a method of treatment, a method of determining a prognosis, a method for stratifying a subject, a method for identifying a patient, or a kit. The groups listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: *****continued on extra sheet***** 1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Remark on Protest <table><tr><td>☐</td><td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td></tr><tr><td>☐</td><td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td></tr><tr><td>☒</td><td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td></tr></table>		☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	☒	No protest accompanied the payment of additional search fees.
☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.						
☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.						
☒	No protest accompanied the payment of additional search fees.						

171

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/53373

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RefSNP No. rs10524523 [online]. 24 January 2006 (24.01.2006) [retrieved on 10.12.2009]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10524523 >	14-18, 22-26, 55-78, 80-85
A	RefSNP No. rs10602329 [online]. 6 May 2008 (06.05.2008) [retrieved on 10.12.2009]. Retrieved from the internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10602329 >	14-18, 22-26, 55-78, 80-85
A	US 2008/0051318 A1 (LI et al.) 28 February 2008 (28.02.2008)	1-3, 14-18, 22-26, 42-46, 55-78, 80-85
A	DEVI et al. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. J. Neurosci. 30 August 2006 (30.08.2006), Vol. 26, No. 35, pages 9057-9068	1-3, 14-18, 22-26, 42-46, 55-78, 80-85
A	YU et al. Comprehensive analysis of APOE and selected proximate markers for late-onset Alzheimer's disease: patterns of linkage disequilibrium and disease/marker association. Genomics. June 2007 (06.2007), Vol. 89, No. 6, pages 655-665	1-3, 14-18, 22-26, 42-46, 55-78, 80-85
A	HUMPHRIES et al. Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40. J. Biol. Chem. 25 March 2005 (25.03.2005), Vol. 280, No. 12, pages 11535-543	1-3, 14-18, 22-26, 42-46, 55-78, 80-85
A	US 2005/0021236 A1 (ASTON et al.) 27 January 2005 (27.01.2005)	1-3, 14-18, 22-26, 42-46, 55-78, 80-85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/53373

Continued from Box III - Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

The special technical feature of Group I is

- performing multiple sequence alignment analysis
- mapping said genetic variants to construct a phylogenetic tree
- examining the genetic variants represented as branches in said tree and determining the ratio of affected and unaffected subjects; and
- identifying a genetic variant where the ratio of affected to unaffected subjects is at least 5% different from one or more adjacent variants on said tree.

The special technical feature of Group I is not present in Group II, which as a special technical feature of correlating TOMM40 variants with Alzheimer's disease.

Although Groups I and II share the technical feature of correlating a genetic variants with the development of a condition, this technical feature does not represent an improvement over the prior art of US 2005/0021236 A1 to Aston et al. which teaches identifying a patient with increased risk for disease by genotype combinations (abstract)

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13.2 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

173

Attorney Docket No. 9719-2-WO

PCT

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

In re: Zinfandel Pharmaceuticals, Inc. (formerly Shiraz Pharmaceuticals, Inc.)
International Application No. PCT/US2009/053373
International Filing Date: 11 August 2009
Priority Date: 12 August 2008
For: Method of Identifying Disease Risk Factors

Date: February 7, 2011

Via Facsimile (+41 22) 338 7080
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
SWITZERLAND

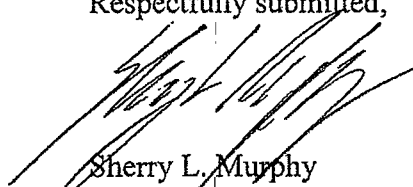
REQUEST FOR CHANGE OF APPLICANT

Dear Sir:

Applicant respectfully requests to change applicant name from Shiraz Pharmaceuticals, Inc. to Zinfandel Pharmaceuticals, Inc. We are attaching herewith copies of the Articles of Merger.

Applicant respectfully requests the International Bureau forward Form IB/306 confirming this change has been recorded. If further information is required, please do not hesitate to contact us.

Respectfully submitted,



Sherry L. Murphy
Attorney for Applicants

Myers Bigel Sibley & Sajovec
Post Office Box 37428
Raleigh, North Carolina 27627
United States of America
Telephone: (919) 854-1400
Facsimile: (919) 854-1401

174

SOSID: 1092106
Date Filed: 11/30/2010 3:35:00 PM
Elaine F. Marshall
North Carolina Secretary of State
C201033400321

*State of North Carolina
Department of the Secretary of State*

ARTICLES OF MERGER

Pursuant to North Carolina General Statute Section 55-11-05(a), the undersigned corporation does hereby submit the following Articles of Merger as the surviving business entity in a merger between two or more business entities,

1. The name of the surviving entity is Zinfandel Pharmaceuticals, Inc., a corporation organized under the laws of North Carolina.
2. The address of the surviving entity is:

One Science Drive, Suite 342, Box 90344
Durham, North Carolina 27708
Durham County
3. The name of the merged entity is Shiraz Pharmaceuticals, Inc., a corporation organized under the laws of North Carolina.
4. A Plan of Merger has been duly approved in the manner required by law by each of the business entities participating in the merger.
5. These Articles will be effective upon filing.

This the 29th day of November, 2010.

ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC.

By: Allen D. Roses, M.D.

Allen D. Roses, M.D.
President & Chief Executive Officer

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

- PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

THAT WHICH IS CLAIMED IS:

1. A method for identifying a genetic variant that is associated with development of a condition of interest, comprising:

(a) determining from biological samples containing DNA the nucleotide sequences carried by a plurality of individual human subjects at a genetic locus of interest, wherein said subjects include both (i) subjects affected with the condition of interest and (ii) subjects unaffected with the condition of interest;

(b) performing multiple sequence alignment analysis to identify genetic variants at said genetic locus from nucleotide sequences observed in said plurality of subjects;

(c) mapping said genetic variants to construct a phylogenetic tree of said subjects, said tree comprising branches that identify variant changes between said subjects on the same cistron;

(d) examining the genetic variants represented as branches in said tree and determining the ratio of affected and unaffected subjects to identify those changes that lead to a changed ratio of affected to unaffected subjects; and then

(e) identifying a genetic variant where the ratio of affected to unaffected subjects is at least 5% different from one or more adjacent variants on said tree

to thereby identify a genetic variant associated with the development of said condition of interest.

2. The method of claim 1, wherein all subjects carry a same known polymorphism for said condition of interest.

3. The method of claim 1 or claim 2, wherein the known polymorphism is an Apolipoprotein E allele.

4. The method of any of claims 1-3, wherein the genetic locus of interest is in linkage disequilibrium with the known polymorphism.

5. The method of any of claims 1-4, wherein the genetic locus of interest is on the same chromosome and less than 10, 20, 30, 40, or 50 kilobases away from the known polymorphism.

177

(b) determining said subject is at increased or decreased risk of Alzheimer's disease when said genetic variant is present or absent.

15. The method of claim 14, further comprising detecting whether said subject is an Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, or E4/E4 subject.

16. The method of claim 14, further comprising detecting whether said subject is an Apo E3/E3 or E3/E4 subject.

17. The method of any of claims 14-16, further comprising the step of:

(c) administering an anti-Alzheimer's disease active agent to said subject in a treatment effective amount when said subject is determined to be at increased risk of Alzheimer's disease.

18. The method of claim 17, wherein said administering step is carried out in said subject at an earlier age when said subject is determined to be at increased risk by the presence or absence of said genetic variant as compared to a subject in which said genetic variant is not present or absent.

19. The method of claim 17 or claim 18, wherein said active agent is selected from the group consisting of acetylcholinesterase inhibitors, NMDA receptor antagonists, peroxisome proliferator-activated receptor agonists or modulators, antibodies, fusion proteins, therapeutic RNA molecules, and combinations thereof.

20. The method of claim 17 or claim 18, wherein said active agent is rosiglitazone or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

21. The method of any of claims 14-20, wherein said genetic variant of the TOMM40 is a poly-T insertion variant at genomic location 50,094,889 of NCBI Build 36.3.

22. In a method of treating a subject for Alzheimer's disease by administering an anti-Alzheimer's disease active agent to said subject in a treatment-effective amount; the improvement comprising:

31. The method of claim any of claims 22-26, wherein said DIP is a poly-T deletion/insertion polymorphism having a poly-T of between 20 and 50 contiguous base pairs.

32. The method of any of claims 22-26, wherein said DIP is a poly-T deletion/insertion polymorphism having a poly-T of between 20 and 50 contiguous base pairs at rs10524523.

33. A method of treatment for a condition of interest, wherein said condition of interest is associated with ApoE and/or TOMM40, for a patient in need thereof, said method comprising:

(a) determining the presence or absence of a genetic variant identified by the method of any of claims 1-12 carried by an individual subject to generate a genetic profile of said patient; and then, if said profile is indicative of said patient being responsive to an active agent,

(b) administering said active agent to said subject in a treatment effective amount to treat said condition of interest.

34. The method of claim 33, wherein said active agent is selected from the group consisting of acetylcholinesterase inhibitors, NMDA receptor antagonists, peroxisome proliferator-activated receptor agonists or modulators, antibodies, fusion proteins, therapeutic RNA molecules, and combinations thereof.

35. The method of claim 33, wherein said active agent is rosiglitazone or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

36. The method of any of claims 33-35, wherein said genetic variant of the TOMM40 is a variant of TOMM40 is at a genetic location of NCBI Build 36.3 selected from the group consisting of: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647, 50,096,697, 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, and 50,099,628.

179

47. The method of any of claims 42-46, wherein said genetic variant of the TOMM40 gene is at the genetic location of NCBI Build 36.3 selected from the group consisting of: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647, 50,096,697, 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, and 50,099,628.

48. The method of any of claims 42-47, wherein said genetic variant of the TOMM40 gene is a deletion/insertion polymorphism (DIP)

49. The method of any of claims 48, wherein said DIP is rs10524523, rs10602329 or DIP3.

50. The method of claim 48 or claim 49, wherein said DIP is an insertion polymorphism.

51. The method of claim 48 or claim 49, wherein said DIP is poly-T deletion/insertion polymorphism.

52. The method of any of claim 48 or claim 49, wherein said DIP is rs10524523.

53. The use of an anti-Alzheimer's disease active agent for the preparation of a medicament for carrying out a method of any of claims 17-52.

54. The use of an anti-Alzheimer's disease active agent for carrying out a method of any of claims 17-52.

55. A method of determining a prognosis or the risk for developing Alzheimer's disease in a patient comprising obtaining a patient profile, wherein said obtaining a patient profile comprises:

detecting the presence or absence of at least one ApoE 2, ApoE 3, or ApoE 4 allele in a biological sample of said patient, and

detecting the presence or absence of at least one TOMM40 deletion/insertion polymorphism (DIP) located in intron 6 or intron 9 of the TOMM40 gene, and then

65. The method of claim 61, wherein said DIP is rs10524523.

66. The method of any of claims 61-65, further comprising detecting whether said subject is an Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, or E4/E4 subject.

67. A method for identifying a patient in a clinical trial of a treatment for Alzheimer's disease comprising:

- a) identifying a patient diagnosed with Alzheimer's disease; and
- b) determining a prognosis for said patient diagnosed with Alzheimer's disease comprising obtaining a patient profile, wherein said patient profile comprises
 - i) detecting the presence or absence of at least one ApoE 3, ApoE 4, and/or ApoE 2 allele in a biological sample of said patient,
 - ii) detecting the presence or absence of at least one TOMM40 deletion/insertion polymorphism (DIP) located in intron 6 or intron 9 of the TOMM40 gene, and
 - iii) converting the patient profile into said prognosis,
 said prognosis including a prediction of whether the patient is a candidate for said clinical trial for said treatment of Alzheimer's disease.

68. The method of claim 67, wherein said DIP is an insertion polymorphism.

69. The method of claim 67, wherein said DIP is poly-T deletion/insertion polymorphism.

70. The method of claim 67, wherein said DIP is rs10524523, rs10602329 or DIP3.

71. The method of claim 67, wherein said DIP is rs10524523.

72. The method of any of claims 67-71, further comprising detecting whether said subject is an Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, or E4/E4 subject.

181

79. The kit of any of claims 73-78, wherein said determining step further comprises detecting whether said subject is an Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, or E4/E4 subject.

80. A kit for determining if a subject is responsive to treatment for a condition of interest, wherein said condition of interest is associated with ApoE and/or TOMM40, with an active agent, said kit comprising:

(A) at least one reagent that specifically detects ApoE 3, ApoE 4, and/or ApoE 2, wherein said reagent is selected from the group consisting of antibodies that selectively bind ApoE isoforms, and oligonucleotide probes that selectively bind to DNA encoding ApoE alleles;

(B) at least one reagent that specifically detects the presence or absence of at least one TOMM40 deletion/insertion polymorphism (DIP) located in intron 6 or intron 9 of the TOMM40 gene; and

(C) instructions for determining that the subject is responsive to treatment for said condition of interest with said active agent of interest by

(i) detecting the presence or absence of an ApoE 3, ApoE4, and/or ApoE 2 isoform in said subject with said at least one reagent;

(ii) detecting the presence or absence of at least one TOMM40 deletion/insertion polymorphism (DIP) located in intron 6 or intron 9 of the TOMM40 gene; and

(iii) determining whether or not the subject is responsive to treatment by observing if the presence of ApoE 3, ApoE 4, and/or ApoE 2 isoform and said TOMM40 DIP is or is not detected with said at least one reagent, wherein the presence of ApoE 3, ApoE 4 and/or ApoE 2 and said TOMM40 DIP indicates that said subject is responsive to said treatment with said active agent.

81. The kit of claim 80, wherein said at least one reagent and said instructions are packaged in a single container.

82. The kit of claim 80 or claim 81, wherein said DIP is an insertion polymorphism.

91. The method of claim 90, wherein said administering step is carried out in said subject at an earlier age when said subject is determined to be at increased risk by the presence or absence of said genetic variant as compared to a subject in which said genetic variant is not present or absent.

92. The method of claim 90 or claim 91, wherein said active agent is selected from the group consisting of acetylcholinesterase inhibitors, NMDA receptor antagonists, peroxisome proliferator-activated receptor agonists or modulators, antibodies, fusion proteins, therapeutic RNA molecules, and combinations thereof.

93. In a method of treating a subject for Alzheimer's disease by administering an anti-Alzheimer's disease active agent to said subject in a treatment-effective amount; the improvement comprising:

administering said active agent to said subject at an earlier age when said subject carries a genetic variant of the TOMM40 gene associated with increased risk of Alzheimer's disease as compared to a corresponding subject who does not carry said genetic variant,

wherein said genetic variant of the TOMM40 is at a genetic location of NCBI Build 36.3 selected from the group consisting of: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647, 50,096,697, 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, and 50,099,628.

94. The method of claim 93, further comprising detecting whether said subject is an Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, or E4/E4 subject.

95. The method of claim 93, further comprising detecting whether said subject is an Apo E3/E3 or E3/E4 subject.

96. The method of any or claims 93-95, wherein said active agent is selected from the group consisting of acetylcholinesterase inhibitors, NMDA receptor antagonists, peroxisome proliferator-activated receptor agonists or modulators, antibodies, fusion proteins, therapeutic RNA molecules, and combinations thereof.

183

91. The method of claim 90, wherein said administering step is carried out in said subject at an earlier age when said subject is determined to be at increased risk by the presence or absence of said genetic variant as compared to a subject in which said genetic variant is not present or absent.

92. The method of claim 90 or claim 91, wherein said active agent is selected from the group consisting of acetylcholinesterase inhibitors, NMDA receptor antagonists, peroxisome proliferator-activated receptor agonists or modulators, antibodies, fusion proteins, therapeutic RNA molecules, and combinations thereof.

93. In a method of treating a subject for Alzheimer's disease by administering an anti-Alzheimer's disease active agent to said subject in a treatment-effective amount; the improvement comprising:

administering said active agent to said subject at an earlier age when said subject carries a genetic variant of the TOMM40 gene associated with increased risk of Alzheimer's disease as compared to a corresponding subject who does not carry said genetic variant,

wherein said genetic variant of the TOMM40 is at a genetic location of NCBI Build 36.3 selected from the group consisting of: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647, 50,096,697, 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, and 50,099,628.

94. The method of claim 93, further comprising detecting whether said subject is an Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, or E4/E4 subject.

95. The method of claim 93, further comprising detecting whether said subject is an Apo E3/E3 or E3/E4 subject.

96. The method of any or claims 93-95, wherein said active agent is selected from the group consisting of acetylcholinesterase inhibitors, NMDA receptor antagonists, peroxisome proliferator-activated receptor agonists or modulators, antibodies, fusion proteins, therapeutic RNA molecules, and combinations thereof.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una variante genética que está asociada con el desarrollo de un padecimiento de interés, el cual comprende:

5 (a) determinar de las muestras biológicas que contienen el ADN las secuencias de nucleótidos portadas por una pluralidad de sujetos humanos individuales en un lugar genético de interés, en donde dichos sujetos incluyen tanto (i) sujetos afectados con el padecimiento de interés como (ii) sujetos no
10 afectados con el padecimiento de interés;

 (b) realizar el análisis de alineación de secuencias múltiples para identificar las variantes genéticas en dichos lugares genéticos de las secuencias de nucleótidos observadas en dicha pluralidad de sujetos;

15 (c) mapear dichas variantes genéticas para construir un árbol filogenético de dichos sujetos, comprendiendo dicho árbol las ramas que identifican los cambios de variante entre dichos sujetos y el mismo cistrón;

 (d) examinar las variantes genéticas representadas como
20 ramas en dicho árbol y determinar la proporción de sujetos afectados y no afectados para identificar esos cambios que conducen a una proporción cambiada de sujetos afectados a no afectados; y entonces

 (e) identificar una variante genética en donde la
25 proporción de sujetos afectados a sujetos no afectados es de

por lo menos 5% diferente de una a más variantes adyacentes en dicho árbol,

para identificar de esa manera una variante genética asociada con el desarrollo de dicho padecimiento de interés.

5 2. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque todos los sujetos portan el mismo polimorfismo conocido para dicho padecimiento de interés.

3. El método tal y como se describe en la reivindicación 1 o reivindicación 2, caracterizado porque el polimorfismo
10 conocido es un alelo de Apolipoproteína E.

4. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizado porque el lugar genético de interés se encuentra en el desequilibrio del enlace con el polimorfismo conocido.

15 5. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizado porque el lugar genético de interés se encuentra en el mismo cromosoma y está a menos de 10, 20, 30, 40, ó 50 kilobases lejos del polimorfismo conocido.

20 6. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizado porque dicho lugar genético es el gen TOMM40.

7. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizado porque dicho
25 padecimiento de interés está asociado con la disfunción

aumentada o disminuida de la mitocondria.

8. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque dicho padecimiento de interés es una enfermedad neurodegenerativa,
5 una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad psiquiátrica, o cáncer.

9. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es una enfermedad de la arteria
10 coronaria.

10. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es diabetes melitus tipo II.

11. El método tal y como se describe en cualquiera de las
15 reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es la enfermedad de Parkinson.

12. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es la enfermedad de Alzheimer.

20 13. Un método para determinar el riesgo aumentado para el desarrollo del padecimiento de interés, el cual comprende:

(a) determinar de una muestra biológica que contiene el ADN una variante genética identificada por el método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12
25 portado por un sujeto individual; y luego

(b) determinar que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado para el desarrollo del padecimiento de interés cuando dicha variante genética está presente.

14. Un método para determinar un riesgo aumentado para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, el cual comprende:

(a) detectar de una muestra biológica que contiene el ADN tomado de dicho sujeto la presencia o ausencia de una variante genética del gen TOMM40 asociada con el riesgo aumentado o disminuido de la enfermedad de Alzheimer, en donde dicha variante es un polimorfismo de eliminación/inserción en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(b) determinar que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado o disminuido de la enfermedad de Alzheimer cuando dicha variante genética está presente o ausente.

15. El método tal y como se describe en la reivindicación 14, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

16. El método tal y como se describe en la reivindicación 14, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

17. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 14 a la 16, el cual comprende además los pasos de:

(c) administrar un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer a dicho sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento cuando dicho sujeto es determinado que se encuentra en un riesgo aumentado de la enfermedad de Alzheimer.

18. El método tal y como se describe en la reivindicación 17, caracterizado porque el paso de administración se lleva a cabo en dicho sujeto en una edad más temprana cuando se ha determinado que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado por la presencia o ausencia de dicha variante genética comparado con un sujeto en el cual dicha variante genética no está presente o está ausente.

19. El método tal y como se describe en la reivindicación 17 o reivindicación 18, caracterizado porque el agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

20. El método tal y como se describe en la reivindicación 17 o reivindicación 18, caracterizado porque el agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

21. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 14 a la 20, caracterizado porque dicha

variante genética del gen TOMM40 es una variante de inserción poli-T en la ubicación genómica 50,094,889 de la Construcción 36.3 del NCBI.

22. Un método de tratamiento de un sujeto para la
5 enfermedad de Alzheimer mediante la administración de un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer a dicho sujeto en una cantidad efectiva de tratamiento; comprendiendo la mejora:

la administración de dicho agente activo a dicho sujeto en
10 una etapa más temprana cuando dicho sujeto es el portador de la variante genética del gen TOMM40 asociado con el riesgo aumentado de la enfermedad de Alzheimer comparado con un sujeto correspondiente quien no es el portador de dicha variante genética,

15 en donde dicha variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40.

23. El método tal y como se describe en la reivindicación 22, el cual comprende además detectar si dicho sujeto es un
20 sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

24. El método tal y como se describe en la reivindicación 23, el cual comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

25. El método tal y como se describe en cualquiera de las
25 reivindicaciones de la 22 a la 24, caracterizado porque dicho

agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, 5 moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

26. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 24, caracterizado porque dicho agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente 10 aceptable de la misma.

27. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque la variante genética del gen TOMM40 es una variante seleccionada del grupo consistente de: rs10524523, 15 rs10602329, y DIP3.

28. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

29. El método tal y como se describe en cualquiera de las 20 reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

30. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 es rs10524523.

25 31. El método tal y como se describe en cualquiera de las

reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T que tiene un poli-T de entre 20 y 50 pares básicos contiguos.

32. El método tal y como se describe en cualquiera de las
5 reivindicaciones de la 22 a la 26, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T que tiene un poli-T de entre 20 y 50 básicos contiguos en el rs10524523.

33. Un método de tratamiento para un padecimiento de
10 interés, en donde dicho padecimiento de interés está asociado con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40, para un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método:

(a) determinar la presencia o ausencia de una variante genética identificada mediante el método tal y como se describe
15 en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12 portada por un sujeto individual para generar un perfil genético de dicho paciente; y luego, si dicho perfil indica que el paciente actúa en respuesta a un agente activo,

(b) administrar dicho agente activo al sujeto en una
20 cantidad de tratamiento efectiva para tratar dicho padecimiento de interés.

34. El método tal y como se describe en la reivindicación 33, caracterizado porque dicho agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa,
25 antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores

del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

35. El método tal y como se describe en la reivindicación
5 33, caracterizado porque dicho agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

36. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 33 a la 35, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 es una variante del gen
10 TOMM40 que está en una ubicación genética de la Construcción 36.3 del NCBI seleccionada del grupo consistente de:
50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317,
50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252,
50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531,
15 50,096,647, 50,096,697, 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361,
50,098,378, 50,098,513, y 50,099,628.

37. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 33 a la 36, caracterizado porque la variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de
20 eliminación/inserción (DIP).

38. El método tal y como se describe en la reivindicación 37, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

39. El método tal y como se describe en la reivindicación
25 37, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de

eliminación/inserción de poli-T.

40. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 37 a la 39, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

5 41. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 37 a la 39, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

42. Un método de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende:

10 (a) detectar de una muestra biológica que contiene el ADN tomado de dicho sujeto la presencia o ausencia de una variante genética del gen TOMM40 asociada con la capacidad de respuesta para un agente activo; y, si dicha variante genética está presente,

15 (b) administrar dicho agente activo a dicho sujeto en una cantidad de tratamiento efectiva para tratar la enfermedad de Alzheimer.

43. El método tal y como se describe en la reivindicación 42, caracterizado porque comprende además detectar si dicho
20 sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

44. El método tal y como se describe en la reivindicación 42, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

25 45. El método tal y como se describe en cualquiera de las

reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizado porque dicho agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del
5 proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

46. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizado porque el
10 agente activo es rosiglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

47. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 46, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 se encuentra en una
15 ubicación genética de la Construcción 36.3 del NCBI seleccionada del grupo consistente de: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647, 50,096,697,
20 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, y 50,099,628.

48. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 47, caracterizado porque dicha variante genética del gen TOMM40 es un polimorfismo de
25 eliminación/inserción (DIP).

49. El método tal y como se describe en la reivindicación 48, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

50. El método tal y como se describe en la reivindicación 5 48 o reivindicación 49, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

51. El método tal y como se describe en la reivindicación 48 o reivindicación 49, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

10 52. El método tal y como se describe en la reivindicación 48 o reivindicación 49, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

53. El uso de un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer para la preparación de un medicamento para llevar a 15 cabo un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 52.

54. El uso de un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer para llevar a cabo un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 52.

20 55. Un método para determinar un pronóstico o el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que comprende obtener un perfil del paciente, caracterizado porque la obtención del perfil del paciente, comprende:

detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo 25 ApoE 2, ApoE 3, o ApoE 4 en una muestra biológica de dicho

paciente, y

detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y luego

5 convertir dicho perfil del paciente en un pronóstico, en donde la presencia de dicho alelo ApoE 2, ApoE 3 o ApoE 4 y la presencia de dicho al menos un polimorfismo DIP del gen TOMM40 identifica a dicho paciente como un paciente que se encuentra en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

10 56. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

15 57. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

58. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

20 59. El método tal y como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

60. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 55 a la 59, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

25 61. Un método para estratificar un sujeto en un subgrupo

de un ensayo clínico de una terapia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho método:

detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE 2, ApoE 3, o ApoE 4 en una muestra biológica del
5 paciente,

detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y

estratificar dicho sujeto en un subgrupo para el ensayo
10 clínico de dicha terapia basada en la presencia o ausencia de dicho al menos un alelo ApoE 2, ApoE 3, o ApoE 4 y/o un alelo del DIP del gen TOMM40.

62. El método tal y como se describe en la reivindicación 61, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de
15 inserción.

63. El método tal y como se describe en la reivindicación 61, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

64. El método tal y como se describe en la reivindicación
20 61, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

65. El método tal y como se describe en la reivindicación 61, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

66. El método tal y como se describe en cualquiera de las
25 reivindicaciones de la 61 a la 65, caracterizado porque

comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

67. Un método para identificar a un paciente en un ensayo clínico de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer que
5 comprende:

a) identificar un paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer; y

b) determinar un pronóstico para dicho paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer que comprende
10 obtener un perfil del paciente, en donde dicho perfil del paciente comprende,

i) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un alelo ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 en una muestra biológica de dicho paciente,

15 ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40, y

iii) convertir el perfil del paciente en dicho pronóstico, incluyendo dicho pronóstico una predicción de si el
20 paciente es un candidato para el ensayo clínico para dicho tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

68. El método tal y como se describe en la reivindicación 67, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

25 69. El método tal y como se describe en la reivindicación

67, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

70. El método tal y como se describe en la reivindicación 67, caracterizado porque el DIP es rs10524523, rs10602329 o
5 DIP3.

71. El método tal y como se describe en la reivindicación 67, caracterizado porque el DIP es rs10524523.

72. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 67 a la 71, caracterizado porque
10 comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

73. Un equipo para determinar si un sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la presentación tardía de la enfermedad de Alzheimer el cual comprende:

15 (A) por lo menos un reactivo que detecta específicamente el alelo ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2, en donde dicho reactivo es seleccionado del grupo consistente de anticuerpos que se enlazan selectivamente a las isoformas ApoE, y muestras de oligonucleótidos que se enlazan selectivamente al ADN que
20 codifica los alelos de ApoE;

(B) por lo menos un reactivo que detecta específicamente la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

25 (C) instrucciones para determinar que el sujeto se

encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía por medio de:

(i) detectar la presencia o ausencia de una isoforma ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 en dicho sujeto con dicho al menos un
5 reactivo;

(ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(iii) observar si el sujeto se encuentra o no en un riesgo
10 aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía observando si la presencia del alelo ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 y dicho DIP del gen TOMM40 es o no detectado con dicho al menos un reactivo, en donde la presencia de la isoforma ApoE 3, ApoE 4 y/o ApoE 2 y dicho
15 DIP del gen TOMM40 indica que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía.

74. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73, caracterizado porque dicho al menos un reactivo y dichas
20 instrucciones están empacadas en un solo contenedor.

75. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

76. El equipo tal y como se describe en la reivindicación
25 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es un

polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

77. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523, rs10602329 o DIP3.

5 78. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 73 o reivindicación 74, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

79. El equipo tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 73 a la 78, caracterizado porque dicho
10 paso de determinación comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

80. Un equipo para determinar si el sujeto actúa al tratamiento para un padecimiento de interés, en donde dicho
15 padecimiento de interés está asociado con el alelo ApoE y/o el gen TOMM40, con un agente activo, comprendiendo dicho equipo:

(A) por lo menos un reactivo que detecta específicamente los alelos ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2, en donde dicho reactivo
20 es seleccionado del grupo consistente de anticuerpos que se enlazan específicamente a las isoformas ApoE, y muestras de oligonucleótidos que se enlazan selectivamente al ADN que codifica los alelos ApoE;

(B) por lo menos un reactivo que detecta específicamente
25 la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de

eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(C) instrucciones para determinar que el sujeto actúa en respuesta al tratamiento para dicho padecimiento de interés con dicho agente activo de interés mediante

(i) detectar la presencia o ausencia de una isoforma ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 en dicho sujeto con dicho al menos un reactivo;

(ii) detectar la presencia o ausencia de por lo menos un polimorfismo de eliminación/inserción (DIP) del gen TOMM40 localizado en el intrón 6 o el intrón 9 del gen TOMM40; y

(iii) determinar si el sujeto actúa o no en respuesta con el tratamiento observando si la presencia de las isoformas ApoE 3, ApoE 4, y/o ApoE 2 y dicho DIP del gen TOMM40 es o no detectado en dicho al menos un reactivo, en donde la presencia de las isoformas ApoE 3, ApoE 4 y/o ApoE 2 y dicho DIP del gen TOMM40 indica que dicho sujeto actúa en respuesta a dicho tratamiento con dicho agente activo.

81. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 80, caracterizado porque dicho al menos un reactivo y dichas instrucciones están empacadas en un solo contenedor.

82. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de inserción.

83. El equipo tal y como se describe en la reivindicación

80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es un polimorfismo de eliminación/inserción de poli-T.

84. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es
5 rs10524523, rs10602329 o DIP3.

85. El equipo tal y como se describe en la reivindicación 80 o reivindicación 81, caracterizado porque dicho DIP es rs10524523.

86. El equipo tal y como se describe en cualquiera de las
10 reivindicaciones de la 80 a la 85, caracterizado porque el paso de determinación comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

87. Un método para determinar el riesgo aumentado para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, el
15 cual comprende:

(a) detectar de una muestra biológica que contiene el ADN tomada de dicho sujeto la presencia o ausencia de una variante genética del gen TOMM40 asociada con el riesgo aumentado o disminuido de la enfermedad de Alzheimer, caracterizado
20 porque dicha variante se encuentra en la localización genética de la Construcción 36.3 del NCBI seleccionado del grupo consistente de: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764,
25 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647, 50,096,697, 50,096,812,

50,096,902, 50,097,361, 50,098,378, 50,098,513, y 50,099,628;
y

(b) determinar si dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado o disminuido de la enfermedad de Alzheimer cuando
5 dicha variante genética está presente o ausente.

88. El método tal y como se describe en la reivindicación 87, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o E4/E4.

10 89. El método tal y como se describe en la reivindicación 87, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

90. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 87 a la 89, caracterizado porque
15 comprende además el paso de:

(c) administrar un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer a dicho sujeto en una cantidad de tratamiento efectiva cuando se determina que dicho sujeto se encuentra en un riesgo aumentado de la enfermedad de Alzheimer.

20 91. El método tal y como se describe en la reivindicación 90, caracterizado porque dicho paso de administración es llevado a cabo en dicho sujeto en una etapa más temprana cuando dicho sujeto se determina que se encuentra en riesgo aumentado debido a la presencia o ausencia de dicha variante
25 genética comparado con un sujeto en el cual la variante

genética no está presente o está ausente.

92. El método tal y como se describe en la reivindicación 90 o reivindicación 91, caracterizado porque dicho agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de
5 acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

93. En un método de tratamiento de un sujeto para la
10 enfermedad de Alzheimer administrar un agente activo contra la enfermedad de Alzheimer a dicho sujeto en una cantidad de tratamiento efectiva; comprendiendo la mejora:

administrar dicho agente activo a dicho sujeto en una edad más temprana cuando dicho sujeto es el portador de una
15 variante genética del gen TOMM40 asociado con un riesgo aumentado de la enfermedad de Alzheimer comparado con un sujeto correspondiente que no es portador de dicha variante genética,

en donde dicha variante genética del gen TOMM40 se
20 encuentra en la localización genética de la Construcción 36.3 del NCBI seleccionado del grupo consistente de: 50,092,565, 50,092,587, 50,093,506, 50,093,609, 50,094,317, 50,094,558, 50,094,716, 50,094,733, 50,094,889, 50,095,252, 50,095,506, 50,095,698, 50,095,764, 50,096,271, 50,096,531, 50,096,647,
25 50,096,697, 50,096,812, 50,096,902, 50,097,361, 50,098,378,

50,098,513, y 50,099,628.

94. El método tal y como se describe en la reivindicación 93, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, o
5 E4/E4.

95. El método tal y como se describe en la reivindicación 93, caracterizado porque comprende además detectar si dicho sujeto es un sujeto Apo E3/E3 o E3/E4.

96. El método tal y como se describe en cualquiera de las
10 reivindicaciones de la 93 a la 95, caracterizado porque dicho agente activo es seleccionado del grupo consistente de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, agonistas o moduladores del receptor activado del proliferador de peroxisoma, anticuerpos, proteínas de fusión,
15 moléculas terapéuticas de ARN, y combinaciones de los mismos.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: G01N 033/048	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/088,203	12/08/2008	US
	61/186,673	12/06/2009	US
	61/224,647	10/07/2009	US
		(72) Inventor(es) ALLEN D. ROSES	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 12/03/2011		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 18/02/2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 11/08/2009		N° publicación: WO 2010/019550 A4	
No. de solicitud PCT/US2009/053373			
(54) Título: MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD			

Reivindicación(es):

1. Un método para identificar una variante genética que está asociada con el desarrollo de un padecimiento de interés, el cual comprende:
- (a) determinar de las muestras biológicas que contienen el ADN las secuencias de nucleótidos portadas por una pluralidad de sujetos humanos individuales en un lugar genético de interés, en donde dichos sujetos incluyen tanto (i) sujetos afectados con el padecimiento de interés como (ii) sujetos no afectados con el padecimiento de interés;
 - (b) realizar el análisis de alineación de secuencias múltiples para identificar las variantes genéticas en dichos lugares genéticos de las secuencias de nucleótidos observadas en dicha pluralidad de sujetos;
 - (c) mapear dichas variantes genéticas para construir un árbol filogenético de dichos sujetos, comprendiendo dicho árbol las ramas que identifican los cambios de variante entre dichos sujetos y el mismo cistrón;
 - (d) examinar las variantes genéticas representadas como ramas en dicho árbol y determinar la proporción de sujetos afectados y no afectados para identificar esos cambios que conducen a una proporción cambiada de sujetos afectados a no afectados; y entonces
 - (e) identificar una variante genética en donde la proporción de sujetos afectados a sujetos no afectados es de por lo menos 5% diferente de una a más variantes adyacentes en dicho árbol, para identificar de esa manera una variante genética asociada con el desarrollo de dicho padecimiento de interés.
2. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque todos los sujetos portan el mismo polimorfismo conocido para dicho padecimiento de interés.
3. El método tal y como se describe en la reivindicación 1 o reivindicación 2, caracterizado porque el polimorfismo conocido es un alelo de Apolipoproteína E.
4. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizado porque el lugar genético de interés se encuentra en el desequilibrio del enlace con el polimorfismo conocido.

5. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizado porque el lugar genético de interés se encuentra en el mismo cromosoma y está a menos de 10, 20, 30, 40, ó 50 kilobases lejos del polimorfismo conocido.
6. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizado porque dicho lugar genético es el gen TOMM40.
7. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizado porque dicho padecimiento de interés está asociado con la disfunción aumentada o disminuida de la mitocondria.
8. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque dicho padecimiento de interés es una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad psiquiátrica, o cáncer.
9. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el padecimiento de interés es una enfermedad de la arteria coronaria.

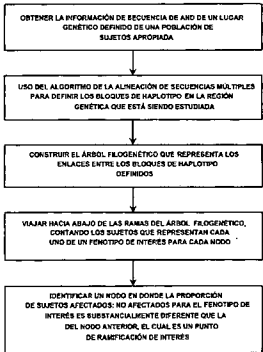


FIG. 1

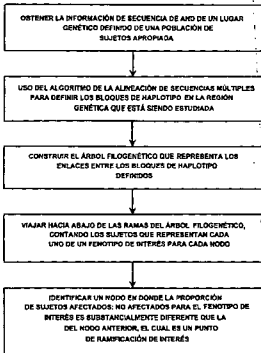


FIG. 1

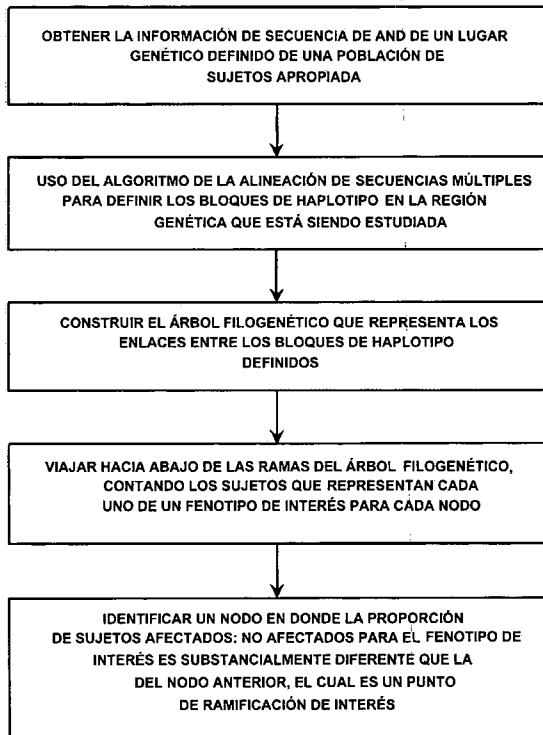


FIG. 1

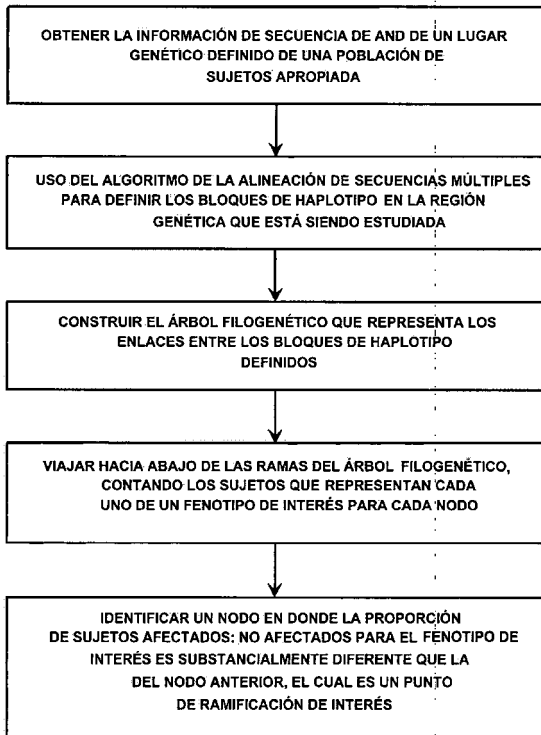


FIG. 1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

209



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0018709

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411748374	01/03/2011	36.726.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-028662- -00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

Código: 18176-841-00 1-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 1 de 2011 - 17:10:08

210

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0015700

Bogotá D.C., Febrero 21 de 2011 - 16:45:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	142703304	21/02/2011	34.450.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-028662-00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

010: 18176-841-001-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 21 de 2011 - 16:45:33

211

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0015701

Bogotá D.C., Febrero 21 de 2011 - 16:45:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	142703304	21/02/2011	34.450.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-028662- -00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

Colo: 18176-841-001-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 21 de 2011 - 16:45:33

212

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0018695

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411748374	01/03/2011	36.726.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1603 INVOCAR LA NOTORIDAD DENTRO DE UN TRAMITE DE OPOSICION	412.000.00	412.000.00
				\$412.000.00

SON: **CUATROCIENTOSDOCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-028662- -00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

Código: 18176-841-001-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 1 de 2011 - 17:10:08

213

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0018730

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411748374	01/03/2011	36.726.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1614 TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANTENIMIENTO DE PATENTE D	935.000.00	935.000.00
				\$935.000.00

SON: **NOVECIENTOS TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-028662- -00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

COLO: 1 8176-841-005-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 1 de 2011 - 17:10:09

214

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0018731

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411748374	01/03/2011	36.726.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1614 TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANTENIMIENTO DE PATENTE D	935.000.00	935.000.00
				\$935.000.00

SON: **NOVECIENTOS TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-028662- -00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

000: 18176-841-001-9.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 1 de 2011 - 17:10:09

2/10



A

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-028662- -00000-0000

Fecha: 2011-03-09 10:57:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTIL.

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	